

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/54, 9/10, 5/10, 1/21, C12P 17/18	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05285 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04097 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juli 1998 (02.07.98) (30) Prioritätsdaten: 197 31 274.8 22. Juli 1997 (22.07.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHRÖDER, Hartwig [DE/DE]; Goethestrasse 5, D-69226 Nußloch (DE). HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse 1, D-67136 Fußgönheim (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING BIOTIN (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BIOTIN (57) Abstract The invention relates to a gene construct containing a biotin gene with the sequence SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 3, and to organisms containing said gene construct, the use of these sequences or the gene construct for producing biotin and to a method for producing biotin. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Genkonstrukt enthaltend ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, Organismen, die dieses Genkonstrukt enthalten, die Verwendung dieser Sequenzen oder des Genkonstrukts zur Herstellung von Biotin, sowie ein Verfahren zur Herstellung von-Biotin.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Herstellung von Biotin

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Genkonstrukt enthaltend ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3, Organismen, die dieses Genkonstrukt enthalten, die Verwendung dieser Sequenzen oder des Genkonstrukts zur Herstellung von Biotin, sowie ein

10 Verfahren zur Herstellung von Biotin.

Als Coenzym spielt Biotin (Vitamin H) eine essentielle Rolle bei enzymkatalysierten Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen. Biotin ist damit ein essentieller Faktor in lebenden Zellen.

15 Biotin muß von fast allen Tieren und einigen Mikroorganismen von außen aufgenommen werden, da sie Biotin nicht selber synthetisieren können. Es ist damit für diese Organismen ein essentielles Vitamin. Bakterien, Hefen und Pflanzen hingegen können Biotin aus Vorstufen selbst synthetisieren (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326, DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5).

Die Biotinsynthese wurde in bakteriellen Organismen speziell im gramnegativen Bakterium Escherichia coli und im grampositiven 25 Bakterium Bacillus sphaericus untersucht (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326). Als erstes bisher bekanntes Intermediat in E. coli wird Pimelyl-CoA (PmCoA) angesehen, das aus der Fettsäuresynthese stammt (DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM 30 Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5 1996). Der Syntheseweg dieser Biotin-Vorstufe in E. coli ist bisher weitgehend unbekannt (Ifuku 1993, Lemoine 1996). Es wurden mit bioC und bioH zwei Gene identifiziert, deren korrespondierende Proteine für die Synthese von Pm-CoA verantwortlich sind. 35 Die enzymatische Funktion der Genprodukte BioH und BioC ist bisher nicht bekannt (Lemoine et al., Mol. Microbio. 19, 1996: 645 - 647, DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5). Pm-CoA wird in vier weiteren enzy- 40 matischen Schritten zum Biotin umgewandelt. Ausgehend vom Pm-CoA findet zuerst die Kondensation mit Alanin zu 7-Keto-8-Amino-Pelargonsäure (KAPA) statt. Das Genprodukt für diese Umsetzung ist BioF (KAPA-Synthetase). KAPA wird mit dem Kosubstrat S-Adenosyl-Methionin durch BioA (DAPA-Aminotransferase) zu 7,8 Diamino-Pelargonsäure transaminiert. Der nächste Schritt führt nach einer 45 ATP-abhängigen Carboxylierungsreaktion zum Dethiobiotin (DTB) und wird durch BioD (Dethiobiotin-Synthase) katalysiert. Im letzten

2

Schritt findet die Umsetzung von DTB zu Biotin statt. Dieser Schritt wird durch BioB (Biotin-Synthetase) katalysiert. Die für die beschriebenen Proteine kodierenden Gene bioF, bioA, bioD, und bioB sind in E. coli auf einem bidirektionalem Operon kodiert.

- 5 Dieses Operon liegt zwischen der λ -attachment-site und dem uvrB Gen Locus bei ca. 17 Minuten auf dem E. coli Chromosom (Berlyn et al. 1996: 1715 - 1902). Auf diesem Operon sind zusätzlich noch zwei weitere Gene kodiert, von denen das eine, bioC, bereits beschriebene Funktionen in der Synthese von Pm-CoA hat, während
- 10 einem offenen Leseraster hinter bioA bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (WO94/8023, Otsuka et al., J. Biol. Chem. 263, 1988: 19577 - 85). Hoch konservierte Homologe zu den E. coli Proteinen BioF, A, D, B wurden in B. sphaericus, B. subtilis, Syneccocystis sp. (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326, Bower et al., J. Bacteriol. 175, 1996: 4122 -
- 15 4130, Kaneko et al., DNA Res. 3, 3, 1996: 109 - 136), Archaeobakterien wie Methanococcus janaschi, Hefen wie Saccharomyces cerevisiae (Zhang et al., Arch. Biochem. Biophys. 309, 1, 1994: 29 - 35) oder in Pflanzen wie Arabidopsis thaliana (Baldet et al., C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie. 319, 2, 1996: 99 - 106))
- 20 gefunden.

- Die Synthese von Pm-CoA scheint in den beiden bisher untersuchten gram-positiven Mikroorganismen anders zu verlaufen als in E. coli. Es konnten keine Homologen von bioH und bioC ge-
- 25 funden werden (Brown et al. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 9, 1991: 295 - 326).

- Biotin ist eine optisch aktive Substanz mit drei Chiralitätszentren. Es wird bisher wirtschaftlich nur über eine vielstufige, teure chemische Synthese hergestellt werden.
- 30

- Alternativ zu dieser chemischen Synthese wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin mit Mikroorganismen aufzubauen. Durch Klonierung des Biotin-Operons auf multi-copy-Plasmide konnte die Biotinsynthese in den mit diesen Genen transformierten Mikroorganismen erhöht werden. Eine weitere Erhöhung der Biotinsynthese wurde durch die Deregulierung der Biotingenexpression über die Selektion von birA-Mutanten erreicht (Pai C. H., J. Bacteriol. 112, 1972: 1280 - 1287). Die Kombination beider Ansätze, das heißt die
- 35 Expression der Plasmid-kodierten Biosynthesegene in einem Regulationsdefizienten Stamm (EP-B-0 236 429), brachte eine weitere Steigerung der Produktivität. Das Biotin-Operon kann dabei entweder unter Kontrolle seines nativen bidirektionalem Promotors
- 40 verbleiben (EP-B-0 236 429), oder seine Gene können unter die
- 45

Kontrolle eines extern regulierbaren Promotors gebracht werden (WO94/8023).

Durch die bisher verfolgten Ansätze zur fermentativen Herstellung von Biotin in *E. coli* konnte keine wirtschaftlich ausreichende Produktivität erreicht werden. Es zeigte sich, daß die Ausbeute in der fermentativen Herstellung von Biotin durch die unvollständige Umwandlung von DTB zu Biotin durch das BioB-Genprodukt (Biotinsynthase) verursacht wird. Zellen die Mutationen im bioB-Gen tragen, sind nicht in der Lage auf DTB zu wachsen und damit DTB in Biotin umzuwandeln. Der chemische und enzymatische Mechanismus der Umwandlung von DTB zu Biotin ist bisher nur unvollständig verstanden und aufgeklärt.

Durch intensive genetische Untersuchungen konnten bisher keine weiteren an der Reaktion beteiligten Proteine identifiziert werden. Eine Charakterisierung der Umwandlung von DTB zu Biotin wurde bisher ausschließlich in bakteriellen bzw. pflanzlichen Zellextrakten durchgeführt (WO94/8023, EP-B-0 449 724, Sanyal et al. Arch. Biochem. Biophys., Vol. 326, No. 1, 1996: 48 - 56 und Biochemistry 33, 1994: 3625 - 3631, Baldet et al. Europ. J. Biochem. 217, 1, 1993: 479 - 485, Méjean et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 217, No. 3, 1995: 1231 - 1237, Ohshiro et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 9, 1994: 1738 - 1741).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß niedermolekulare Faktoren wie S-Adenosylmethionin, NADPH, Cystein, Thiamin, Fe^{2+} , Asparagin, Serin, Fruktose 1-6-bisphosphat die Synthese von Biotin stimulieren (Ohshiro et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 9, 1994: 1738 - 1741, Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995: 19158 - 19165, Ifuk et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 2, 1995: 185 - 189). Neben diesen niedermolekularen Faktoren wurden weitere Proteine identifiziert, die die Synthese von Biotin aus DTB in Gegenwart von BioB stimulieren. Dabei handelt es sich um Flavodoxin und Flavodoxin-NADPH-Reduktase (Birch et al., J. Biol. Chem. 270, 32, 1995: 19158 - 19165, Ifuk et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 2, 1995: 185 - 189, Sanyal et al., Arch. Biochem. Biophys. 326, 1, 1996: 48 - 56).

Die Biotin- und Liponsäuresynthese weisen eine große Homologie auf. In beiden Synthesewegen wird auf der letzten Synthesestufe zwischen nicht aktivierte C-Atome ein Schwefel bzw. zwei Schwefelatome inseriert. Die Synthese von Liponsäure ist bisher nur unzureichend charakterisiert (DeMoll, E., Escherichia coli and Salmonella, eds. Neidhardt, F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN 1-55581-084-5). Es wurden bisher nur zwei notwendige Gene in *E. coli* identifiziert: lipA und lipB. Beide Gene liegen in einem Operon, mit einem bisher nicht charak-

terisiertem Open Reading Frame (= ORF) zwischen beiden Genen. Ein
weitere Gen *lplA* ist in der Lage Liponsäure über ein Lipoyl-AMP-
Intermediat auf Lysin zu übertragen. Diese Reaktion hat somit
Ähnlichkeit mit der Aktivität von *birA*. Zwischen *LipA* und *BioB*
5 konnten durch Sequenzvergleiche homologe Bereiche in der Amino-
säuresequenz identifiziert werden. Diese umfassen unter anderem
ein Cystein-Cluster. Es konnte gezeigt werden, daß *LipA* für den
Einbau von zwei Schwefelatomen in die Liponsäure katalysiert
(DeMoll, E., *Escherichia coli* and *Salmonella*, eds. Neidhardt,
10 F. C. et al. ASM Press, Washington DC, USA, 1996: 704 - 708, ISBN
1-55581-084-5).

Über die Herkunft des Schwefels im Biotinmolekül existieren
widersprüchliche Ergebnisse. Bei Untersuchungen der Biotinsynt-
hese in Gesamtzellextrakten wurde gezeigt, daß in Gegenwart von
15 ³⁵S-markiertem Cystein Radioaktivität in Biotin inkorporiert
wurde; weder mit ³⁵S-markiertem Methionin noch mit S-Adenosyl-
Methionin konnte ein Schwefel-Einbau ins Biotinmolekül nachge-
wiesen werden (Ifuku et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 2,
1995: 184 - 189, Birch et al., *J. Biol. Chem.* 270, 32, 1995: 19158
20 - 19165).

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen mit gereinigtem *BioB*-
Protein in Gegenwart von ³⁵S-markiertem Cystein und ohne Zugabe
von Zellextrakten, bei denen zwar eine Biotin-Synthese aber kein
25 Einbau von Radioaktivität in das Biotinmolekül beobachtet werden
konnte (Sanyal et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 326, 1, 1996:
48 - 56, Méjean et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2127, 3,
1995: 1231 - 1237). Unter diesen Synthesebedingungen ohne Zell-
extraktzugabe war die gebildete Biotinmenge niedrig und entsprach
30 maximal ca. 2 Mol Biotin/Mol *BioB* (Sanyal et al., *Arch. Biochem.*
Biophys. 326, 1, 1996: 48 - 56) bzw. 0,1 Mol Biotin/Mol *BioB*
(Méjean et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2127, 3, 1995:
1231 - 1237). Nach diesen Untersuchungen kann ein Einbau von
Schwefel in Biotin erfolgen, ohne das Cystein als Schwefeldonor
35 verwendet wird. Diese Biotinbildung ohne externe S-Quelle könnte
durch eine Übertragung von Schwefel aus dem in *BioB* nachge-
wiesenen 2Fe-2S Cluster erklärt werden. Die tatsächliche
Schwefelquelle für die Biotinsynthese ist nach wie vor unklar.
Damit konnte bisher in vitro keine echte katalytische Aktivität
40 von *BioB* nachgewiesen werden.

Trotz dieser Vielzahl von Ansätzen reicht die Ausbeute an Biotin
durch mikrobielle Fermentation bisher für eine industrielle
Produktion nicht aus.

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein technisches, fermentatives Verfahren zur Herstellung von Biotin zu entwickeln, daß eine möglichst optimale Umwandlung von Dethiobiotin in Biotin aufweist und damit eine verbesserte Biotinsynthese ermöglicht.

5

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Biotin, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 sowie seine funktionellen Varianten, Analoge oder Derivate in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus, der in der Lage ist Biotin zu synthetisieren, exprimiert, diesen züchtet und das synthetisierte Biotin direkt, nach Abtrennung der Biomasse oder nach Reinigung des Biotins verwendet, gelöst.

15 Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Biotingene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 3 werden in der SwissProt-Datenbank unter den "Accession"-Nummern AE000364 und D90811 geführt. Die Sequenz D90811 wird außerdem von Aiba et al. in DNA Res. 3, 6, 1996: 363 - 377 beschrieben. Bei beiden Sequenzen wird in der Datenbank eine Homologie zum NifS-Protein vermerkt.
20 Weitere Informationen zu diesen Sequenzen sind der Datenbank bzw. der Publikation nicht zu entnehmen.

Durch Expression der Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus läßt sich die Produktivität der Biotinbiosynthese deutlich steigern. Durch die Expression der Gene wird die Synthese von Biotin aus Dethiobiotin um mindestens den Faktor 2 gegenüber der Kontrolle ohne diese Gene, bevorzugt um einen Faktor größer 3, gesteigert. Bevorzugt wird die Sequenz SEQ ID No. 1 verwendet.
30

Nach Isolierung und Sequenzierung sind die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Biotingene mit den Nukleotidsequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 erhältlich, die für die in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID No. 4 angegebenen Aminosäuresequenzen oder deren Allelvariationen kodieren. Unter Allelvarianten sind SEQ ID No. 1- oder SEQ ID No. 3-Varianten zu verstehen, die 40 bis 100 % Homologie auf Aminosäureebene, bevorzugt 50 bis 100 %, ganz besonders bevorzugt 80 bis 100 % aufweisen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität aber erhalten bleibt.
40

45

6

Unter Analoge von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 sind beispielsweise ihre bakteriellen, pilzlichen, pflanzlichen oder Hefe-Homologen, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

- 5 Derivate sind beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber
- 10 die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.
- 15 Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -30 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression erhöht wird. Vorteilhafterweise geschieht dies durch eine veränderte Shine-Dalgarno-Sequenz.
- 20 Als prokaryontische Wirtsorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen prinzipiell alle Biotin synthetisierenden gram-negativen oder gram-positiven Bakterien in Frage. Als gram-negative Bakterien seien beispielhaft Enterobacteriaceae wie die
- 25 Gattungen *Escherichia*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia* oder *Salmonella*, *Pseudomonadaceae* wie die Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Methanomonas*, *Comamonas*, *Cellulomonas* oder *Acetobacter*, *Azotobacteraceae* wie
- 30 die Gattungen *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* oder *Derxia*, *Neisseriaceae* wie die Gattungen *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Kingella*, *Neisseria* oder *Branhamella*, die *Rhizobiaceae* wie die Gattungen *Rhizobium* oder *Agrobacterium* oder die gram-negativen Gattungen *Zymomonas*, *Chromobacterium* oder *Flavobacterium*,
- 35 genannt. Als gram-positive Bakterien seien beispielhaft die Endosporen-bildenden gram-positiven aeroben oder anaeroben Bakterien wie die Gattungen *Bacillus*, *Sporolactobacillus* oder *Clostridium*, die coryneformen Bakterien wie die Gattungen *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* oder *Kurthia*, die Actinomycetales
- 40 wie die Gattungen *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* oder *Nocardia*, die *Lactobacillaceae* wie die Gattungen *Lactobacillus* oder *Lactococcus*, die gram-positiven Kokken wie die Gattungen *Micrococcus* oder *Staphylococcus*, genannt.
- 45 Bevorzugt werden Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Clos-*

- tridium, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Streptomyces, Rhizobium, Agrobacterium oder Staphylococcus im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet. Besonders bevorzugt werden Gattungen und Arten wie Escherichia coli,
- 5 Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Salmonella typhimurium, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas mutabilis, Pseudomonas chlororaphis, Pseudomonas fluorescens, Comamonas acidovorans, Comamonas testosteroni, Acinetobacter calcoaceticus, Azotobacter vinelandii, Chromobacterium violaceum,
- 10 Bacillus subtilis, Bacillus sphaericus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus megaterium, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, Arthrobacter citreus, Arthrobacter paraffineus, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium primorioxydans,
- 15 Corynebacterium sp., Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium linens, Brevibacterium sp., Streptomyces lividans, Rhizobium leguminosarum oder Agrobacterium tumefaciens. Vorteilhafterweise werden Bakterien verwendet, die schon eine erhöhte natürliche Biotinproduktion besitzen.
- 20 Die taxonomische Stellung der aufgeführten Gattungen unterlag in den letzten Jahren einem starken Wandel und befindet sich noch immer im Fluß, da falsche Gattungs- und Artnamen korrigiert werden. Aufgrund dieser in der Vergangenheit häufig erforderlichen
- 25 taxonomischen Umgruppierungen der genannten Gattungen innerhalb der bakteriellen Systematik sind auch andere als die oben genannten Familien, Gattungen und Arten für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.
- 30 Als eukaryontische Wirtsorganismen des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen prinzipiell alle Biotin synthetisierenden Organismen in Frage wie Pilze, Hefen, Pflanzen oder pflanzliche Zellen. Als Hefen seien die Gattungen Rhodotorula, Yarrowia, Sporobolomyces, Saccharomyces oder Schizosaccharomyces bevorzugt genannt. Besonders bevorzugt sind die Gattungen und Arten Rhodotorula rubra,
- 35 Rhodotorula glutinis, Rhodotorula graminis, Yarrowia lipolytica, Sporobolomyces salmonicolor, Sporobolomyces shibatanus oder Saccharomyces cerevisiae.
- Als Wirtsorganismus können prinzipiell alle Pflanzen verwendet
- 40 werden, bevorzugt werden Pflanzen, die in der Tierernährung oder in der humanen Ernährung eine Rolle spielen wie Mais, Weizen, Gerste, Roggen, Kartoffeln, Erbsen, Bohnen, Sonnenblumen, Palmen, Hirse, Sesam, Kopra oder Raps. Auch Pflanzen wie Arabidopsis thaliana oder Lavendula vera sind geeignet. Besonders bevorzugt
- 45 werden pflanzliche Zellkulturen, Protoplasten aus Pflanzen oder Kaluskulturen.

Vorteilhafterweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen oder pflanzliche Zellen verwendet, die in der Lage sind Biotin in das Anzuchtsmedium auszuscheiden und die gegebenenfalls zusätzlich schon eine erhöhte natürliche Biotinsynthese haben. Vorteilhafterweise können diese Organismen noch bezüglich der Regulation ihrer Biotinbiosynthese defekt sein, das heißt es findet keine oder nur eine sehr verringerte Regulation der Synthese statt. Dieser Regulationsdefekt hat zur Folge, daß diese Organismen schon eine wesentlich höhere Biotinproduktivität besitzen. Ein solcher Regulationsdefekt ist beispielsweise von *Escherichia coli* als *birA*-Defektmutanten bekannt und sollte vorzugsweise in Form eines durch äußere Einflüsse induzierbaren Defektes, beispielsweise temperaturinduzierbar, in den Zellen vorhanden sein. Es können im Prinzip auch Organismen verwendet werden, die keine natürliche Biotinproduktion aufweisen, nachdem sie mit den Biotingenen transformiert wurden.

Um die Biotinproduktivität insgesamt weiter zu steigern sollten die Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhafterweise zusätzlich mindesten ein weiteres Biotingen ausgewählt aus der Gruppe *bioA*, *bioB*, *bioF*, *bioC*, *bioD*, *bioH*, *bioP*, *bioW*, *bioX*, *bioY* oder *bioR* enthalten. Dieses zusätzliche Gen oder diese zusätzlichen Gene können in ein oder mehreren Kopien in der Zelle vorhanden sein. Sie können auf dem gleichen Vektor wie die Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 lokalisiert sein oder auf getrennten Vektoren oder aber chromosomal integriert worden sein. Auch die Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 können ins Genom inseriert werden.

Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt sind die Biotingensequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 sowie deren funktionelle Varianten, Analoge oder Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation durch Biotin mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente inseriert werden. Die Biotingene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1 und/oder

SEQ ID No. 3 können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI^q-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ -P_R- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefepromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Genkonstrukt können weitere Biotingene ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR in einer oder mehreren Kopien enthalten sein, die einen eigenen Promotor haben können oder aber unter der Regulation des Promotors der Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 liegen können.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in den oben genannten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen YEp6, YEp13 oder pEM-BLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Vektoren dar. Weitere Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

Unter Expressionssysteme sind die Kombination aus den oben beispielhaft genannten Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren wie Plasmide, Viren oder Phagen wie das T7 RNA Polymerase/Promoter System oder Vektoren mit regulatorischen Sequenzen für den Phagen λ zu verstehen.

10

Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme die Kombination aus Escherichia coli und seinen Plasmiden und Phagen und den dazugehörigen Promotoren sowie Bacillus und seine Plasmide und Promotoren zu verstehen.

5

Für die vorteilhafte erfindungsgemäße Expression der SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 sind außerdem weitere 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen geeignet.

- 10 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Biotingene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

15

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Biotingenexpression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem

- 20 starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 25 Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Biotingenexpression bewirken.

- Eine Steigerung der von den Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID
30 No. 3 abgeleiteten Proteinen und ihrer Enzymaktivität läßt sich zum Beispiel gegenüber den Ausgangsenzymen durch Veränderung der entsprechenden Gensequenzen oder der Sequenzen seiner Homologen durch klassische Mutagenese wie UV-Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Mutagentien und/oder durch gezielte Mutagenese wie
35 site directed mutagenesis, Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) erzielen. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität neben der beschriebenen Genamplifikation durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymbiosynthese reprimieren und/oder durch Synthese aktiver statt inaktiver Enzyme erreicht werden.

40

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die Umwandlung von DTB in Biotin und damit die Biotinproduktivität insgesamt über die in die Organismen über Vektoren und/oder chromosomal klonierten Biotingene mit den Sequenzen SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 vorteil-

- 45 haft gesteigert.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die SEQ ID No. 1 und/oder SEQ ID No. 3 enthaltenen Mikroorganismen in einem Medium, das das Wachstum dieser Organismen ermöglicht angezüchtet. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelemente.

- 10 Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Zucker wie Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bis-phosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Polyole wie Glycerin, 15 Alkohole wie Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure oder Aminozucker, die auch gleichzeitig als Stickstoffquelle verwendet werden können.

- 20 Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen können.

- 30 Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen. Ein wichtiger Faktor zur Steigerung der Produktivität im erfindungsgemäßen Verfahren ist der Zusatz von 35 Fe^{2+} oder Fe^{3+} -Salzen und/oder Kaliumsalzen zum Produktionsmedium.

- Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder 40 Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Methionin oder Lysin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

- 45 Zur Stabilisierung der Vektoren mit den Biotingenen in den Zellen können gegebenenfalls Antibiotika dem Medium zugesetzt werden.

12

Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Fermentation ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert
5 oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder aber je nach Bedarf während der Fermentation nachgegeben werden.

Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, daß die Organismen optimal wachsen und daß die bestmöglichen Ausbeuten erreicht werden.
10 Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15 °C bis 40 °C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C. Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von 8 bis 240 Stunden
15 bevorzugt von 8 bis 120 Stunden ausreichend. Innerhalb dieser Zeit reichert sich die maximale Menge an Biotin im Medium an und/oder ist nach Aufschluß der Zellen verfügbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Biotin kann
20 kontinuierlich oder batch-weise durchgeführt werden. Werden aus den mit den Biotingenen transformierten Pflanzenzellen ganze Pflanzen regeneriert, so können diese nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ganz normal angezchtet und vermehrt werden.

25 Beispiele:

Ausgehend von der Überlegung, daß an der Umsetzung von DTB zu Biotin außer BioB und den bekannten weiteren Kofaktoren möglicherweise ein Fe-S-Cluster-regenerierendes Enzym beteiligt sein könnte, wurde der Versuch unternommen ein solches hypotetisches
30 Gen zu identifizieren und zu klonieren.

NifS-Gene sind in der Lage Schwefelatome in einem Fe-S-Cluster von Proteinen, die an der Stickstofffixierung beteiligt sind, zu regenerieren (Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993: 2754 - 2758 und Biochemistry 33, 1994: 4714 - 4720). Durch Vergleich aller bekannten Proteine der NifS-Klasse in den Datenbanken Swiss-Prot und PIR mit dem Programmpaket Lasergene (DNA-Star Inc.) unter dem Megalign Modus, konnte ein streng konservierter Bereich dieser Proteine mit der Aminosäuresequenz HK(I,L)xGPxG
35 (x entspricht Aminosäuren mit geringer bzw. nicht erhaltener Konservierung) identifiziert werden. Die Tatsache der vollständigen Konservierung dieser Sequenz deutet auf eine wichtige Rolle dieser Aminosäuren (= As) in der Funktion dieser Proteinen hin. Diese konservierten Aminosäuren werden im folgenden als Motiv I
40
45 bezeichnet.

13

Das derart beschriebene As-Motiv diene als Vergleichsequenz für eine weitere Analyse der Datenbank Swiss-Prot/PIR Release 93 bzw. 94 nach Proteinen bzw. ORF's (= open reading frame) zu suchen, in denen diese NifS-Funktionssequenz vollständig konserviert ist.

- 5 Als Programm für die Sequenzanalyse wurde das Programm Geneman des Pakets DNA-Star eingesetzt. Die Analyseparameter wurden wie folgt fixiert: Menue "consensus sequence" mit einer 80% Konservierung des Motivs.
- 10 Als Ergebnis dieser Recherche wurde gefunden, daß neben bereits als NifS-homologe Proteine identifizierte Proteine weitere Proteine/ bzw. ORF's existieren, die dieses Sequenzmotiv aufweisen. Unter den in der Datenbank enthaltenen weiteren Sequenzen konnte ein offenes Leseraster aus E. coli mit signifikanter
- 15 Konservierung der Konsensus-Sequenz identifiziert werden, das wie die eigenen Arbeiten zeigten an der Biotinsynthese beteiligt ist. Dieses offene Leseraster mit der Bezeichnung ECU29581_24 (= SEQ ID No. 1 = ORF401) kodiert für ein hypothetisches von dieser Sequenz abgeleitetes Protein von 401 As. Es zeigte sich, daß
- 20 diese Sequenz im Rahmen der E. coli Genomsequenzierung durch F. Blattner und Mitarbeitern sequenziert worden war (DNA-Research 1996), ohne daß dessen Funktion erkannt worden war. Diese Sequenz (SEQ ID No. 1) wird im Nachfolgenden als BioS1 bezeichnet.
- 25 Vergleicht man die Proteinsequenz von BioS1 mit der von NifS aus A. vinelandii (Programm: DNA-Star-"Megalign" im Modus: paarweises Alignement nach Lipman-Pearson, Analyseparameter: k-tuple 2, gap-penalty 4, gap-length-penalty 12) zeigt sich, daß ECU29581_24 auch in anderen Bereichen der Sequenz über einen Sequenzbereich von 218 As eine Homologie von 27,6% zu NifS aus A. vinelandii
- 30 aufweist. Gegenüber dem als NifS identifiziertem Protein aus Rhodococcus capsulatus beträgt die Homologie 25,3 % über einen Bereich von 376 As.
- 35 In der Datenbank Swiss-Prot/PIR konnten weitere Sequenzen identifiziert werden, die Homologien zu ECU29581_24 aufweisen (Programm Geneman/ Modus sequence similarity; Einstellungen default). Die höchste gefundene Sequenzähnlichkeit zu ECU29581_24 zeigt ein translatierter ORF (= open reading frame) aus H. influenza (Datenbankbezeichnung HIU00082_62). Zwischen BioS1 und HIU00082_62
- 40 wurde eine Sequenzhomologie von 45,5% über die gesamte Länge beider Proteine gefunden. Die Sequenzähnlichkeit bzw. die Homologie beider Proteine ist damit signifikant höher, als zwischen ECU29581_24 (= BioS1) und NifS aus R. capsulatus bzw. A. vinelandii. Es handelt sich damit vermutlich um das H. influenza
- 45 Homologe zu BioS1.

Von Fleischmann et al. (Science. 269, 1995: 496-512) war neben dem ORF HIU00082_62 ein weiterer ORF (HIU00072_10) in H. influenza aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu NifS gefunden worden.

- 5 Aufgrund dieser Beschreibung von Fleischmann et al. wurde gefolgert, daß neben bioS1 auch in E. coli noch ein weiteres NifS-ähnliches Gen existiert. Dieses hypothetische Gen wurde bioS2 genannt.

10 1. Konstruktion der Vektoren pHS1 und pHS2:

- Die Plasmide pHS1 und pHS2 bestehen aus verschiedenen sog. Kassetten, die einen Replikationsursprung, eine Resistenzkassette, einen Promotor, eine Klonierungsstelle, und Terminatoren
15 tragen. Die Plasmide wurden aus unterschiedlichen DNA-Fragmenten zusammengesetzt. Die dafür notwendigen DNA-Fragmente wurden durch PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Plasmiden als Matrizen hergestellt.

20 a.) Herstellung der Kasette mit einem Replikationsursprung:

- Um den Replikationsursprung aus einem P15A-Replikon-enthaltenden Plasmid als klonierbare Kasette bereitzustellen, wurde durch eine PCR Reaktion mit dem Plasmid pRep4 (Quiagen) mit den Oligonukleotiden P15A,1 (5'-GGCCCCTAGGGGATATATTCGCTTCCTCGC-3') und
25 P15A,2 (5'-GGCCACTAGTAACAACCTTATATCGTATGGGG-3') ein DNA-Fragment von 919 Basen Länge aus dem Plasmid isoliert. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen AvrII und SpeI in einem geeigneten Puffer geschnitten.

30 PCR-Bedingungen:

- Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung der Replikationskasette aus dem Plasmid pRep4 verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei
35 50 °C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72 °C für 1 min. über 30 Zyklen.

b.) Herstellung der Kanamyzin-Resistenzkasette:

- 40 Um eine Kanamyzin-Resistenzkasette als klonierbare Kasette bereitzustellen wurde durch eine PCR Reaktion aus einem die Kanamyzin-Resistenzkasette enthaltenden Plasmid (pRep4, Quiagen) mit den Oligonukleotiden Kan-R,1 (5'-GGCCGAGCTCTCGAACCCCA-GAGTCCCGCT-3') und Kan-R,2 (5'-GGCCGACGTCGGAATTGCCAGCTGGGGCGC-3')
45 ein DNA-Fragment von 952 Basen Länge isoliert. Das Fragment wurde mit AatII und SacI in einem geeigneten Puffer geschnitten.

PCR-Bedingungen:

Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung der Kanamycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pRep4 verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50 °C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72 °C für 1 min. über 30 Zyklen.

c.) Herstellung der Terminationsbereiche:

- 10 * Um den Terminator T0 aus dem Phagen Lambda als klonierbare Kassette bereitzustellen wurde durch eine PCR Reaktion mit dem Plasmid pDS12-luzi (Schroder H. et al., EMBO Journal. 12, 11, 1993: 4137 - 4144) als Matrize mit den Oligonukleotiden T0,1 (5'-GGCCGAGCTCGCTTGGACTCCTGTTGATAG-3') und T0,2 (5'-GGCCACTAGTGCTTGGATTCTCACCAATAAAAAACGCCC-3') ein DNA-Fragment von 120 Basen Länge isoliert. Das Fragment wurde durch die Enzyme SpeI und SacI in einem geeigneten Puffer geschnitten.

20 Matrize für T0: pDS12-luzi

- 25 Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung des Terminationsbereiches aus dem Plasmid pDS12-luzi verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50 °C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72 °C für 0,5 min. über 30 Zyklen. Anschließend wurde ein 120 bp großes Fragment isoliert und aufgereinigt. Dieses wurde mit je 20 U SpeI und SacI verdaut.

- 30 * Um den Terminator T1 aus dem rrnB-Operon als klonierbare Kassette bereitzustellen, wurde durch eine PCR Reaktion mit dem Plasmid pDS12-luzi (Schroder et al. siehe oben) als Matrize und mit Hilfe der Oligonukleotide T1,1 (5'-GCCCCCTAGGTCTAGGGCGGCGGATTTGTCC-3') und T1,2 (5'-GGCCTCTAGAGGCATCAAA-TAAAACGAAAGGC-3') ein DNA-Fragment von 120 bp Länge isoliert. Das Fragment wurde durch die Enzyme XbaI und AvrII in einem geeigneten Puffer geschnitten.

40 Matrize für T1: pDS12-luzi

- 45 Es wurden 2,5 U Taq-Polymerase sowie 15 pMol der Oligonukleotide in 100 µl Ansatzlösung zur Isolierung des Terminationsbereiches aus dem Plasmid pDS12-luzi verwendet. Die Oligonukleotide wurden bei 50 °C angelagert. Die Elongation erfolgte bei 72 °C für 0,5 min. über 30 Zyklen. Anschließend

16

wurde ein 120 bp großes Fragment isoliert und aufgereinigt.
Dieses wurde mit je 20 U XbaI und AvrII verdaut.

d.) Herstellung der Promotoren für pHS1 und pHS2:

5

Die Oligonukleotide PPHS1,1

(5'-TCGAGATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCCGATCCTAAGGTTTACAATTGTGAGCGCTC
ACAATTATGATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACGCTAGCGGTAC-3') und
PPHS1,2

10 (5'-CGCTAGCGTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTGAATCTATCATAATTGTGAGCGCTC
ACAATTGTAAACCTTAGGATCGGCTAATCTTATGGATAAAAATGCTATC-3') bzw.

PPHS2,1

(5'-AATTCTCCCTATCAGTGATAGAGATTGACATCCCTATCAGTGATAGAGATACTGAGACATC
ACCAGGACGCACTGACCG-3')⁹ und

15 PPHS2,2

(5'-AATTCGGTCAGTGCGTCCTGGTGATGTCTCAGTATCTCTATCACTGATAGGGATGTCAATC
TCTATCACTGATAGGGAGG-3') wurden durch chemische Synthese herge-
stellt. Die Oligonukleotide PPHS1,1 und PPHS1,2 sowie PPHS2,1 und
PPHS2,2 wurden jeweils in einer Konzentration von 1µg/µl ver-

20 mischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und dann langsam abgekühlt. Die
aneinandergelagerten Oligonukleotide wurden in einer Konzentra-
tion von 10 ng/µl in der Ligation eingesetzt. Die Oligonucleotide
PPHS1,1 und PPHS1,2 bildeten den Promotor für das Plasmid pHS1
und die Oligonucleotide PPHS2,1 und PPHS2,2 den für das Plasmid
25 pHS2.

e.) Herstellung der Klonierungsstelle:

Zur Konstruktion der Klonierungsstelle wurden die beiden Oligonu-
kleotide PMCS1,1

30 (5'-GTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCC
CGGGGGATCCCATGGTA-3') und PMCS1,2

(5'-ACGCGTACCATGGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCG
ACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACC-3') synthetisiert. Die beiden Oligonu-
kleotide wurden in einer Konzentration von 1µg/µl vermischt, 5 min
35 bei 95 °C inkubiert und dann langsam abgekühlt. Die aneinander-
gelagerten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von
10 ng/µl in der Ligation eingesetzt.

f.) Klonierungsablauf von pHS1 und pHS2

40

Ausgehend von pDS12 luci wurde die ampR-Kassette des Plasmides
durch einen SacI/AatII-Verdau herausgeschnitten und durch ein
entsprechendes SacI/AatII-Fragment ersetzt, das die Kanamycin-
Resistenzkassette enthält. Nach Transformation und Isolierung
45 positiver Klone wurde der erhaltene Vektor SpeI/SacI verdaut und
der durch PCR-amplifizierte Terminator T0 als SpeI/SacI-Fragment
stromabwärts der Kanamycin-Resistenzkassette eingesetzt. Nach

17

Transformation und Isolierung positiver Klone wurde der erhaltene Vektor wurde mit XbaI/AvrII verdaut und der durch PCR-amplifizierte Terminator T1 als XbaI/AvrII-Fragment eingesetzt. Der erhaltene Vektor wurde mit XhoI/EcoRI verdaut und mit den jeweils aneinandergelagerten Promotoroligonukleotiden (PPHS1,1 und PPHS1,2 bzw. PPHS2,1 und PPHS2,2) ligiert. Der entstandene Vektor wurde XbaI verdaut und mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt, dann KpnI verdaut und die Vektorbande ohne das Luziferase-Fragment isoliert. Zwei weitere aneinandergelagerte Oligonukleotide (PMCS1,1 PMCS1,2), die die Klonierungsstelle enthalten, wurden mit den so verdauten Vektoren ligiert.

2. Klonierung von bioS1 (ECU29581_24, SEQ ID No. 1):

- Das Gen, das für BioS1 kodiert, wurde aus dem Chromosom von E. coli durch eine PCR-Reaktion amplifiziert, mit optimierten Translationssignalen versehen und in einen Vektor kloniert, der eine Überexpression des Gens in E. coli Stämmen ermöglicht.
- a.) Entwicklung von Oligonukleotiden zur Amplifizierung des bioS1 Gens aus dem E. coli Chromosom:

BioS1 soll als Expressionskassette bestehend aus einer ribosomalen Bindungsstelle, dem Startkodon der kodierenden Sequenz und dem Stopkodon zwischen zwei Erkennungstellen für Restriktionsenzyme amplifiziert werden. Für beide Restriktionsschnittstellen wurde die Erkennungssequenz von MluI gewählt. Das bioS1 Gen wurde mit Hilfe der Oligonucleotide PbioS1,1 (5'-CGCACGCGTGAGGAGTACCAT-GAACGT-3') und PbioS1,2 (5'-CGCACGCGTTAATCCACCAATAATT-3') kloniert.

Durchführung der PCR:

Bedingungen:

- Als Matrize wurden 0,5µg chromosomale DNA von E. coli W3110 verwendet. Die Oligonukleotide PbioS1,1 und PbioS1,2 wurden in einer Konzentration von je 15 pMol eingesetzt. Die Konzentration an dNTP's betrug 200 µM. Als Polymerase wurden 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers eingesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100µl.

Amplifikationsbedingungen:

- Die Denaturierung der DNA erfolgte für 2 min bei 94 °C. Anschließend wurden die Oligonukleotide für 30 sec bei 55 °C angelagert. Die Elongation erfolgte für 45 sec bei 72 °C. Die PCR-Reaktion wurde über 30 Zyklen durchgeführt.

18

Das erhaltene DNA-Produkt mit einer Größe von 1200 bp wurde aufgereinigt und durch MluI im geeigneten Puffer verdaut.

- 5 µg des Vektors pHS1 wurden durch MluI verdaut und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Nach Denaturierung der SAP wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 durch den Rapid-DNA-Ligation Kit nach der Vorschrift des Herstellers ligiert. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte in den Stamm E. coli XL-1-blue.
- 10 Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert. Die richtige Orientierung des bioS1-Fragments in pHS1 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestimmt. Das erhaltene Konstrukt wurde pHS1 bioS1 (Figur 1) genannt. Die Sequenz von pHS1 bioS1 ist SEQ ID No. 5 zu entnehmen.
- 15 Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS1 im Vektor ist SEQ ID No. 6 zu entnehmen. 2 µg des Vektors pHS1 bioS1 wurden mit MluI verdaut und das Gen bioS1 durch ein Agarosegel isoliert. Der Vektor pHS2 wurde mit MluI verdaut mit SAP-Phosphatase dephosphoryliert und mit dem Fragment bioS1 zusammen in einer Ligation ange-
- 20 setzt. Der Ligationsansatz wurde in XL1-blue transformiert und positive Klone in der richtigen Orientierung durch Plasmidisolierung und Restriktionsverdau identifiziert. Der erhaltene Vektor wurde pHS2 bioS1 (Figur 2) genannt. Die Sequenz von pHS2 bioS1 ist SEQ ID No. 9 zu entnehmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS1 im Vektor ist SEQ ID No. 10 zu entnehmen.
- 25

3. Klonierung von bioS2 (SEQ ID No. 3):

- Um in E. coli weitere Gene zu klonieren, die für Genprodukte kodieren die am Aufbau von Fe-S-Clustern beteiligt sind, wurde
- 30 folgender Weg beschritten:

- Ein Sequenzvergleich (Programm Megalign, Modus Clustal) von As-Sequenzen von Proteinen der Datenbank Swissprot/PIR mit einer hohen Homologie (>40%) zum NifS Protein aus A. vinelandii zeigte,
- 35 daß neben dem bereits beschriebenen Sequenzmotiv I auch der N-Terminus dieser Proteine eine signifikante Konservierung zeigt. Als eine typische N-terminale konservierte Sequenz von Proteinen der NifS-Familie wurde die As-Sequenz mit der Sequenz MIYLDNXATT identifiziert und als Motiv II a bezeichnet.
- 40

- Eine Analyse der Datenbank Swissprot/PIR auf eine Konservierung dieser Sequenz mit mehr als 80% zeigte ein weiteres Protein in E. coli. Von diesem Protein ist durch Edman-Abbau erhaltene N-terminale Sequenz von 11 As bekannt (Datenbankbezeichnung:
- 45 UP06_Ecoli). Dieses Protein wurde als hypothetisches NifS-Homolog

19

angesehen und in Analogie zu BioS1 als im folgenden als BioS2 bezeichnet.

Um das Gen für das Protein BioS2 zu klonieren und zu sequenzieren, wurde folgender Weg beschritten. Ausgehend von der Proteinsequenz HIU00072_10 wurde zum einen das konservierte Aminosäure-Motiv I zum anderen die oben genannte As-Sequenz von UP06_Ecoli benutzt, um degenerierte Oligonukleotide herzustellen, die in der Lage sind, ein Fragment des bioS2 Gens zu amplifizieren. Dafür wurden die beiden As-Motive HIU00072_10 (Motiv I) und UP06_Ecoli (Motiv II b, MKLPIYLDYSAT) in die korrespondierenden DNA-Sequenzen revers translatiert. Aus dem Motiv II wurde so das degenerierte Oligonukleotid PbioS2,1 (5'-ATGAARYTNCCNATHHTAYYTNGAY-TAYWSNGCNAC-3') und aus dem Motiv I das degenerierte Oligonukleotid PbioS2,2 (5'-cccaghggrccrctgcagyttrtgrccrga-3') synthetisiert.

Durchführung der PCR-Reaktion:

Als Matrize diente chromosomale DNA von E. coli W3110. Je 0,5 µg der Oligonukleotide Pbio2,1 und PbioS2,2 wurden mit je 15 pMol Nukleotidmix, 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers umgesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100µl.

Amplifikationsbedingungen:

Die Denaturierung erfolgte für 2 min bei 94 °C. Die Anlagerung der Oligonukleotide wurde bei 45 °C, die Elongation für 45 sec bei 72 °C durchgeführt. Die PCR wurde über 30 Zyklen durchgeführt. Durch die PCR konnten drei Fragmente selektiv amplifiziert werden, von denen eines die aus den Sequenzvergleichen erwartete Größe von 600 bp hatte. Dieses DNA-Fragment wurde durch Agarosegel-Aufreinigung isoliert und mit dem Oligonukleotid PbioS2,2 sequenziert. Die erhaltene DNA-Sequenz wurde in allen sechs möglichen Leserastern translatiert. Die erhaltenen translatierten As-Sequenzen wurden dann mit der translatierten AS-Sequenz von HIU00072_10 bzw. NifS aus A. vinelandii verglichen. Eines der translatierten Leseraster zeigt eine hohe Homologie mit der As-Sequenz des beschriebenen ORF HIU00072_10 und mit bioS2 bezeichnet.

40

Um die gesamte DNA-Sequenz von bioS2 (= SEQ-ID-No. 3) zu bestimmen und zu klonieren, wurde folgender Weg beschritten:

Zuerst wurde eine markierten DNA-Sonde hergestellt, die zu bioS2 homolog ist. Dies geschah mit Hilfe des PCR-DIG-Labeling-Kit (Boehringer Mannheim). Als Matrize für die Herstellung der DIG-

20

DNA-Sonde diente das beschriebene PCR-Produkt, das durch die Oligonukleotide Pbios2,1 und Pbios2,2 hergestellt wurde.

Die Bedingungen der PCR waren:

5

Einsatz: 1µl der PCR-Matrize, 5µl Nukleotid-DIG-dUTP-Mix, je 15 pMol Oligonukleotid Pbios2,1 und Pbios2,2, Puffer des Kits mit 1,75 mM MgCl₂ 0,75 µl Expand-Polymerase-Mix (Boehringer Mannheim).

10 Amplifikationsbedingungen:

Aufschmelzen der DNA bei 94 °C für 2 min, Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94 °C, Annealing 30 sec bei 45 °C, Elongation 3.30 min bei 68 °C über 10 Zyklen, Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94 °C, Annealing 30 sec bei 45 °C, Elongation 3.30 min bei 68 °C, Ver-
längerung der Elongation für 20 sec pro Zyklus über 20 Zyklen. Aufreinigung des DIG-markierten Frgaments durch PCR-Purification Kit.

20

4. Southern-Analyse von bioS2 mit chromosomaler DNA

In weiteren Schritten wurde genomische DNA durch Restriktionsenzyme verdaut und durch Southern-Hybridisierung mit Hilfe der markierten DNA-Sonde analysiert.

25

Chromosomale E. coli DNA W3110 (10µg) wurde mit den folgenden Restriktionsenzymen vollständig verdaut EcoRI, BamHI, Acc65I, HindIII, SalI. Das Volumen der Ansätze betrug 50 µl, die Enzymmenge je 30 U. Die Ansätze wurden 4h inkubiert. Die derart verdaute DNA wurden durch ein 1% Agarosegel in TBE-Puffer (Sambrook,

30

J. Fritsch, E F. Maniatis, T. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989, ISBN 0-87969-373-8) aufgetrennt und mit Hilfe einer Druckübertragungskammer (Stratagene) auf eine Nylon-Membran (Boehringer Mannheim) übertragen und durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, Stratagene) kovalent an der Membran

35

fixiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der DIG-markierten DNA-Sonde in DIG-Easyhyb Puffer (Boehringer Mannheim) bei 65 °C für 15 h. Die Entwicklung des Blots nach Anweisungen des Hersteller zeigt Hybridisierung der bioS2-DIG-DNA-Sonde mit Banden, die mit Größen von ca. 3 - 4 kb im Fall von Acc65I, EcoRI und HindII

40

bestimmt wurden. BamHI verdaute DNA zeigte eine Hybridisierung mit der bioS2-Sonde mit einem Fragment eines wesentlich höheren Molekulargewichts. Zur weiteren Klonierung wurden Fragmente von 3 - 4 kb bevorzugt weiter bearbeitet.

45

21

Klonierung von bioS2 durch inverse PCR

Im Fall des EcoRI-Verdaus wurde ein Fragment von ca. 4 kb identifiziert, das das gesuchte Gen trägt. Das gesamte Gen wurde dann durch die Technik der inversen PCR amplifiziert und kloniert. Im ersten Schritt der inversen PCR wurde chromosomale E. coli DNA durch EcoRI vollständig verdaut. Im zweiten Schritt wurde dann die EcoRI verdaute DNA bei geringen DNA-Konzentrationen (ca. 20 ng/ml) aus dem vorher beschriebenen Restriktionsverdaus durch Ligase kovalent ligiert, unter Bedingungen unter denen statistisch gesehen eine intramolekulare Verknüpfung erfolgt. Im dritten Schritt wurde dann eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der Oligonukleotide eingesetzt werden, deren Sequenz spezifisch für das gesuchte Zielgen ist.

Spezifisch amplifizierte DNA-Segmente können anhand ihrer Größe identifiziert werden, die sich aus der Größe des Restriktionsfragments aus der Southern-Analyse und aus der Lokalisierung der Oligonukleotide im bekannten Abschnitt des Gens ergibt. Derart identifizierte Fragmente werden dann in einen geeigneten Vektor wie pBS SK Bluescript/ pCR Script (Stratagene) kloniert und sequenziert.

Experimentelle Durchführung:

1 µg chromosomale DNA aus dem Stamm W3110 wurde durch 15 U EcoRI (Boehringer Mannheim) in einem Volumen von 50 µl vollständig verdaut. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch Auftrag von 30 µl auf ein Agarosegel überprüft. Fragmente dieses Verdaus chromosomaler DNA (10 µl des Verdaus = 200 ng) wurden in einem Volumen von 100 µl zusammen mit 10 µl Ligationspuffer und 2 U T4-Ligase (Boehringer Mannheim) für 15h bei 15 °C inkubiert. (intramolekulare Ligationsreaktion). Nach der Ligationsreaktion wurde die T4-Ligase durch Inkubation bei 65 °C für 20 min. inaktiviert. Von diesem Ligationsansatz wurden 5 µl als Matrize für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Primer PbioS2,3 (5'-GCGTGGGTAAACTGCCTATCGACCTGAGCC-3') und PbioS2,4 (5'-CTACGCTTCCTCAGCCTGCCAGCCGAAA-3') wurden ausgehend von der Sequenz von bioS2 synthetisiert.

Oligonukleotid PbioS2,3 hybridisiert auf der 5'-Seite von bioS2 und bewirkt das die Elongation der Amplifikation der kodierenden Sequenz auf der 5'-Seite auf dem Gegenstrang in 3'-Richtung stattfindet.

45

22

Oligonukleotid PbioS2,4 hybridisiert auf der 3'-Seite von bioS2 und bewirkt das die Elongation der Amplifikation der kodierenden Sequenz auf der 3'-Seite auf dem kodierenden Strang in 3'-Richtung stattfindet.

5

Einsatz: 5 µl des Ligationsansatz, 1,75 µl Desoxynukleotid-Mischung (350 µmol, Boehringer Mannheim), je 15 pMol Oligonukleotid PbioS2,5 und PbioS2,6, Puffer 1des Kits mit 1,75 mM MgCl₂ 0,75 µl Expand-Polymerase-Mix.

10

Bedingungen für die Amplifikation der ligierten E. coli DNA mit Primer PbioS2,3/ PbioS2,4. Expand-Kit (Boehringer Mannheim) Aufschmelzen der DNA 2 min bei 94 °C, Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94 °C, Annealing 30 sec bei 61 °C, Elongation 3.30 min bei 68 °C über 10 Zyklen, Aufschmelzen der DNA 10 sec bei 94 °C, Annealing 30 sec bei 61 °C, Elongation 3.30 min bei 68 °C, Verlängerung der Elongation für 20 sec pro Zyklus über 20 Zyklen.

15

Durch die beschriebene Amplifikation wurde ein PCR-Produkt von ca. 3 kb erhalten. Dieses DNA-Fragment zeigte in einer Southern-Hybridisierung unter stringenten Bedingungen eine deutliche Hybridisierung mit der bereits beschriebenen bioS2-DIG-DNA-Sonde.

20

Es wurde angenommen, daß dieses DNA-Fragment DNA-Sequenzen enthält, die zu bioS2 hochgradig homolog sind. Daher wurde dieses DNA-Fragment in einen Vektor kloniert, um es weiter zu charakterisieren und zu sequenzieren. Das DNA-Fragment wurde mit dem pCR-Skript Kit (Stratagene) zuerst laut Anweisung des Herstellers mit Pfu-Polymerase behandelt und dann in den Vektor pCR Skript ligiert. Der Ligationsansatz wurde in XL-1-blue Zellen (Stratagene) transformiert und auf LB-Amp ausplattiert. Ein positiver Klon, der ein Fragment trug, wurde durch Minipräparationsanalyse identifiziert. Die Sequenzierung ergab die in SEQ ID No. 3 wiedergegebene Gesamtsequenz (= bioS2).

25

30

BioS2 wurde dann als Expressionskassette analog zu bioS1 amplifiziert und kloniert. Dafür wurden dem Gen durch PCR mit den Oligonukleotiden PbioS2,5 (5'-CATGACGCGTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGAAATTACCGATT TATTGG-3') und PbioS2,6 (5'-GCGACGCGTGATTAATGATGAGCCCAT-3') eine Erkennungstelle für MluI und eine optimierte Shine-Dalgarno-Sequenz auf der 5' Seite und eine Erkennungstelle für MluI auf der 3' Seite zugefügt.

35

40

Durchführung der PCR:

Als Matrize wurden 0,5 µg chromosomale DNA von W3110 eingesetzt. Die Oligonukleotide PbioS2,5 und PbioS2,6 wurden in einer Konzentration von je 15 pMol eingesetzt. Die Konzentration an dNTP's

45

23

betrug 200 µM. Als Polymerase wurden 2,5 U Pwo DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im Reaktionspuffer des Herstellers eingesetzt. Das Volumen der PCR-Reaktion betrug 100 µl.

5 Amplifikationsbedingungen:

Denaturierung 2 sec bei 94 °C, Anlagern der Oligonukleotide für 30 sec bei 55 °C, Elongation für 45 sec bei 72 °C. Die PCR wurde über 30 Zyklen durchgeführt.

10

Das erhaltene DNA-Produkt der richtigen Größe von ca. 1200 bp wurde durch den PCR-Purification-Kit (Boehringer Mannheim) aufgereinigt und durch MluI im geeigneten Puffer verdaut.

15

5 µg des Vektors pHS2 wurden durch MluI verdaut und durch Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Nach Denaturierung der SAP wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 durch den Rapid-DNA-Ligation Kit nach der Vorschrift des Herstellers ligiert. Die Transformation

20

des Ligationsansatzes erfolgte in den Stamm XL-1-blue. Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert. Die richtige Orientierung des bioS2-Fragments in pHS2 wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestimmt.

25

Der Vektor wurde mit pHS2 bioS2 (Figur 3) bezeichnet. Die Sequenz von pHS2 bioS2 ist SEQ ID No. 11 zu entnehmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS2 im Vektor ist SEQ ID No. 12 zu entnehmen. Analog wurde die Klonierung von bioS2 in den Vektor pHS1 vorgenommen. Die Sequenz von pHS1 bioS2 ist SEQ ID No. 7 zu entnehmen (Figur 4). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von bioS2 im

30

Vektor ist SEQ ID No. 8 zu entnehmen.

5. Konstruktion des Plasmids pHBbio14

35

Die in vivo-Klonierung des Bio-Operons wurde durch einen transduzierenden Lambda-Phagen durchgeführt. Die Selektion von Lambda bio⁺ Phagen erfolgte durch die Transduktion eines E. coli bio⁻ negativen Stammes zu bio⁺. Der isolierte bio⁺ transduzierende Lambda Phage wurde propagiert und die Lambda DNA aufgereinigt. Es folgte die Excision eines 8,7 kb EcoRI/HindIII-Fragments mit dem

40

gesamten Biotin-Operon aus der Lambda-Phagen DNA und Ligation des Fragments in pBR322, der EcoRI/HindIII-geschnitten worden war. Positive Klone wurden durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse identifiziert.

45

24

Deletion eines 1,2 Kb Fragments 3' von bioD

Nicht benötigte Gensequenzen auf der 3'-Seite des bioD Gens wurden entfernt. Dafür wurde durch PCR-Reaktion hinter dem Stopkodon von bioD eine EcoRI-Schnittstelle eingebaut. Die Entwicklung der Oligonukleotide Pbio1,1 (5'-AATAAGGAATTCTTATGTACTTTCCGGTTGCCG-3') und Pbio1,2 (5'-AACAGCAGCCTGCAGCTGGATTA-3') für diese PCR-Reaktion erfolgte nach der Operon-Sequenz von Otsuka et al. (J. Biol. Chem. 263, 1988: 19577-85).

10

PCR-Bedingungen:

2,5 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und je 15 pmol Primer wurden in einem Volumen von 100 µl umgesetzt. Das Annealing wurde bei 50 °C und die Elongation für 1 min bei 72 °C über 30 Zyklen durchgeführt. Isolierung und Aufreinigung eines 488 bp-Fragments erfolgte über Agarose-Gel. Verdau des erhaltenen Fragments mit EcoRI/PstI. Verdau von pHBbio1 mit EcoRI/PstI. Isolierung eines 9,5 kb Fragments.

20

Das 9,5 kb Fragments wurde mit dem 488 bp Fragments legiert und in XL1-blue-Zellen transformiert. Erhaltene Klone wurden durch Plasmidpräparation und durch Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA mit den Enzymen EcoRI und HindIII analysiert, positive Klone, die ein 5,9 kb Fragment trugen, wurden identifiziert. Es wurde ein Klon, der mit pHBbio2 bezeichnet wurde, isoliert. Von diesem Klon wurde Plasmid-DNA gewonnen. 5 µg pHBbio2 wurden mit EcoRI/HindIII verdaut und das 5,9 kb Fragment isoliert, das die gesamten Biotin-Biosynthesegene enthielt.

25

30

5 µg des Plasmids pAT153 wurden mit EcoRI und HindIII verdaut. Das erhaltenen 5,9 kb Fragment mit den Biotin-Biosynthesegenen wurde mit dem verdauten Vektor pAT153 ligiert und in XL-1-blue transformiert. Erhaltene Klone wurden durch Plasmidpräparation und durch Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA mit den Enzymen

35

EcoRI und HindIII analysiert. Positive Klone wurden identifiziert und ein Klon mit der Bezeichnung pHBio14 isoliert.

6. Erhöhung der Biotin-Produktivität durch Überexpression von bioS1

40

Stamm BM4092 (Barker und Campbell) wurde durch eine P1-Transduktion mit Hilfe eines P1-Lysats, das auf einem recA::Tn10 tragendem Stamm gewachsen war, nach recA⁻ transduziert. Der Erfolg der Transduktion wurde durch eine erhöhte UV-Sensitivität der positiven Transduktanten nachgewiesen. Daraufhin wurde der erhaltene Stamm LU8091 mit dem Plasmid pHBbio14 nach der CaCl₂-Methode transformiert und auf LB-Ampizillin 100 µg/ml angezogen. Ein Klon

45

25

wurde isoliert, und dieser wurde jeweils mit den Plasmiden pHS1 bioS1 und pHS2 bioS2 durch die CaCl_2 -Methode transformiert und auf LB-Agar, Ampizillin 100 $\mu\text{g/ml}$ und Kanamycin 25 $\mu\text{g/ml}$ selektio-
niert.

5

Je eine Kolonie der jeweiligen Transformanden wurde in einer DYT-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotika angeimpft und für 12 h inkubiert. Die Übernachtskultur (= ÜNK) wurde eingesetzt um eine 10 ml Kultur in TB-Medium (Sambrook, J. Fritsch, E F. Maniatis,

10

T. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989 ISBN 0-87969-373-8) mit den entsprechenden Antibiotika anzuimpfen und über 24h Stunden angezogen. Nach Ende des Wachstums wurden die Zellen vom Kulturüberstand durch Zentrifugation abgetrennt und

15

die Biotin- und Dethiobiotin-Konzentration durch einen ELISA mit Streptavidin und Avidin im Überstand bestimmt. Die Ergebnisse dieser Bestimmung sind Tabelle I zu entnehmen.

Tabelle I: Bestimmung der Biotin- und Dethiobiotinkonzentration

20

Stamm	Plasmid I	Plasmid II	Biotin mg/l	Dethiobiotin mg/l
Lu8091	pHBbio14		9,4	45,6
Lu8091	pHBbio14	pHS1 bioS1	15,3	19,7
Lu8091	pHBbio14	pHS2 bioS1	19,2	15,8

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Biotin, dadurch gekennzeichnet,
5 daß man ein Biotingen mit der Sequenz SEQ ID No. 1 oder
SEQ ID No. 3 sowie seine funktionellen Varianten, Analoge
oder Derivate in einem prokaryontischen oder eukaryontischen
Wirtsorganismus, der in der Lage ist Biotin zu synthetisie-
ren, exprimiert, diesen züchtet und das synthetisierte Biotin
10 direkt, nach Abtrennung der Biomasse oder nach Reinigung des
Biotins verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
15 Expression der Biotingene nach Anspruch 1 zu einer gesteiger-
ten Umwandlung von Dethiobiotin in Biotin führt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
es sich bei den Varianten um Gene handelt, die auf der von
den Sequenzen nach Anspruch 1 abgeleiteten Aminosäureebene
20 eine Homologie von 40 bis 100 % aufweisen und eine gestei-
gerte Biotinsynthese ermöglichen.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeich-
net, daß als Wirtsorganismus ein Organismus ausgewählt aus
25 der Gruppe der Gattungen Escherichia, Citrobacter, Serratia,
Klebsiella, Salmonella, Pseudomonas, Comamonas, Acinetobac-
ter, Azotobacter, Chromobacterium, Bacillus, Clostridium,
Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Lactococcus,
Lactobacillus, Streptomyces, Rhizobium, Agrobacterium, Sta-
30 phylococcus, Rhodotorula, Sporobolomyces, Yarrowia, Schizo-
saccharomyces oder Saccharomyces verwendet wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeich-
net, daß als Wirtsorganismus eine regulationsdefekte Biotin-
35 mutante verwendet wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeich-
net, daß die Expression mindestens einer Kopie der Biotingene
nach Anspruch 1 allein oder mit einer oder mehreren Kopien
40 mindestens eines weiteren Biotingens ausgewählt aus der
Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX,
bioY oder bioR in einem prokaryontischen oder eukaryontischen
Wirtsorganismus erfolgt.
- 45 7. Genkonstrukt enthaltend ein Biotingen mit der SEQ ID No. 1
oder SEQ ID No. 3, sowie seine funktionellen Varianten,
Analoge oder Derivate, das mit einem oder mehreren Regu-

lationssignalen zur Erhöhung der Genexpression und/oder Proteinexpression funktionell verknüpft ist und/oder dessen natürliche Regulation ausgeschaltet wurde.

- 5 8. Genkonstrukt nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Vektor inseriert wurde, der für die Expression des Gens in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus geeignet ist.
- 10 9. Genkonstrukt nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Biotingene nach Anspruch 7 in einer oder mehreren Kopien zusammen mit einer oder mehreren Kopien mindestens eines weiteren Gens ausgewählt aus der Gruppe bioA, bioB, bioF, bioC, bioD, bioH, bioP, bioW, bioX, bioY oder bioR im Vektor vorliegt.
- 15
10. Organismen enthaltend ein Genkonstrukt gemäß den Ansprüchen 7 bis 9.
- 20 11. Verwendung einer Sequenz gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Biotin.
12. Verwendung eines Genkonstrukts gemäß den Ansprüchen 7 bis 9 zur Herstellung von Biotin.

25

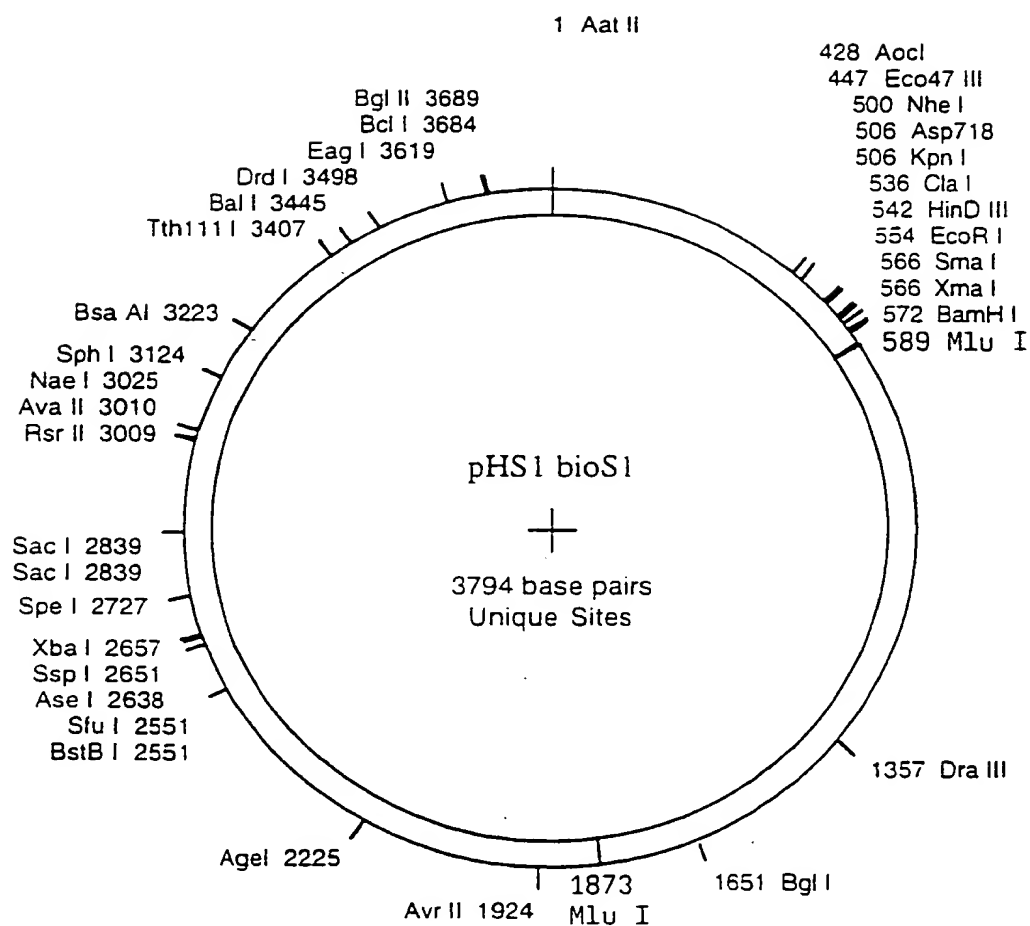
30

35

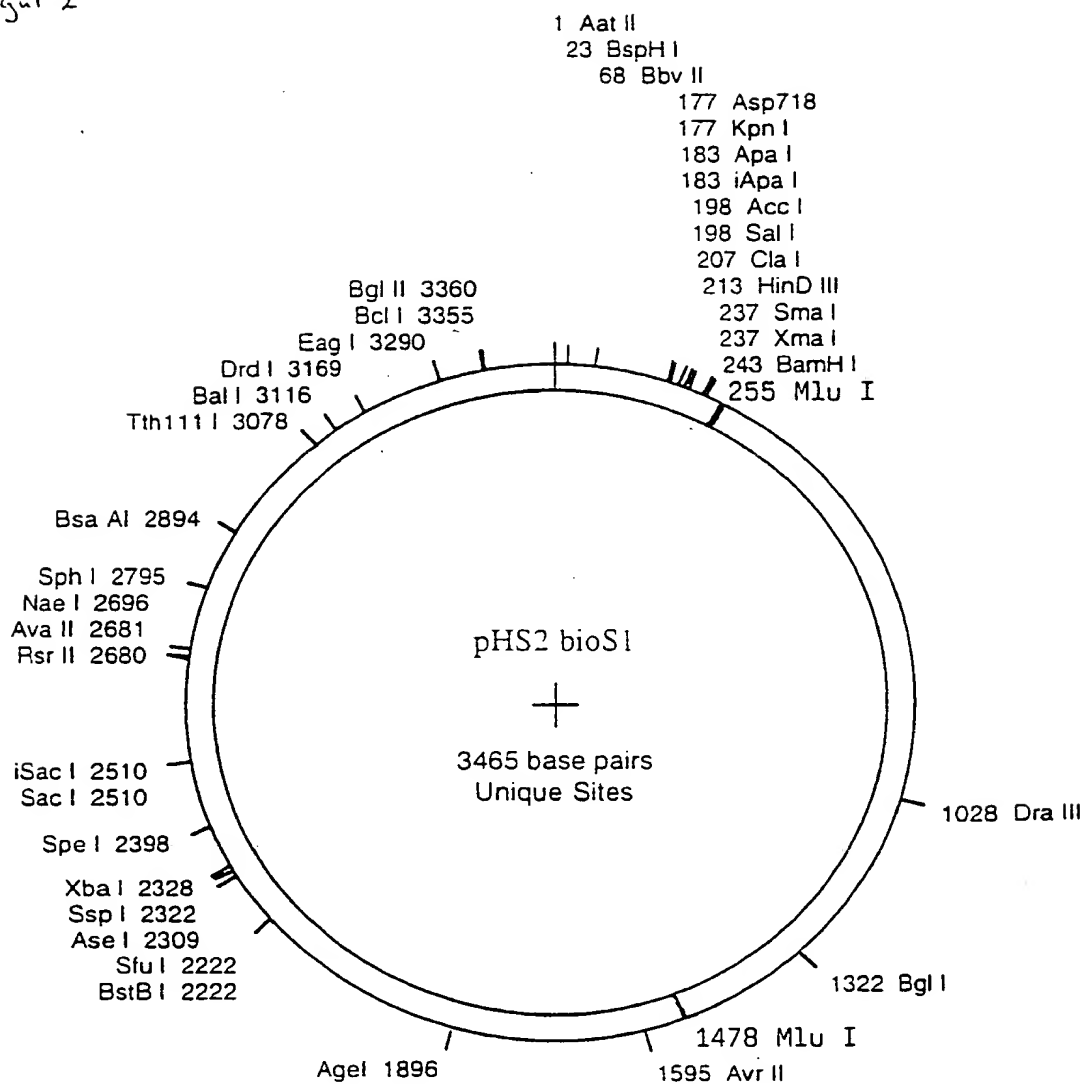
40

45

Figure 1



Figur 2



Figur 3

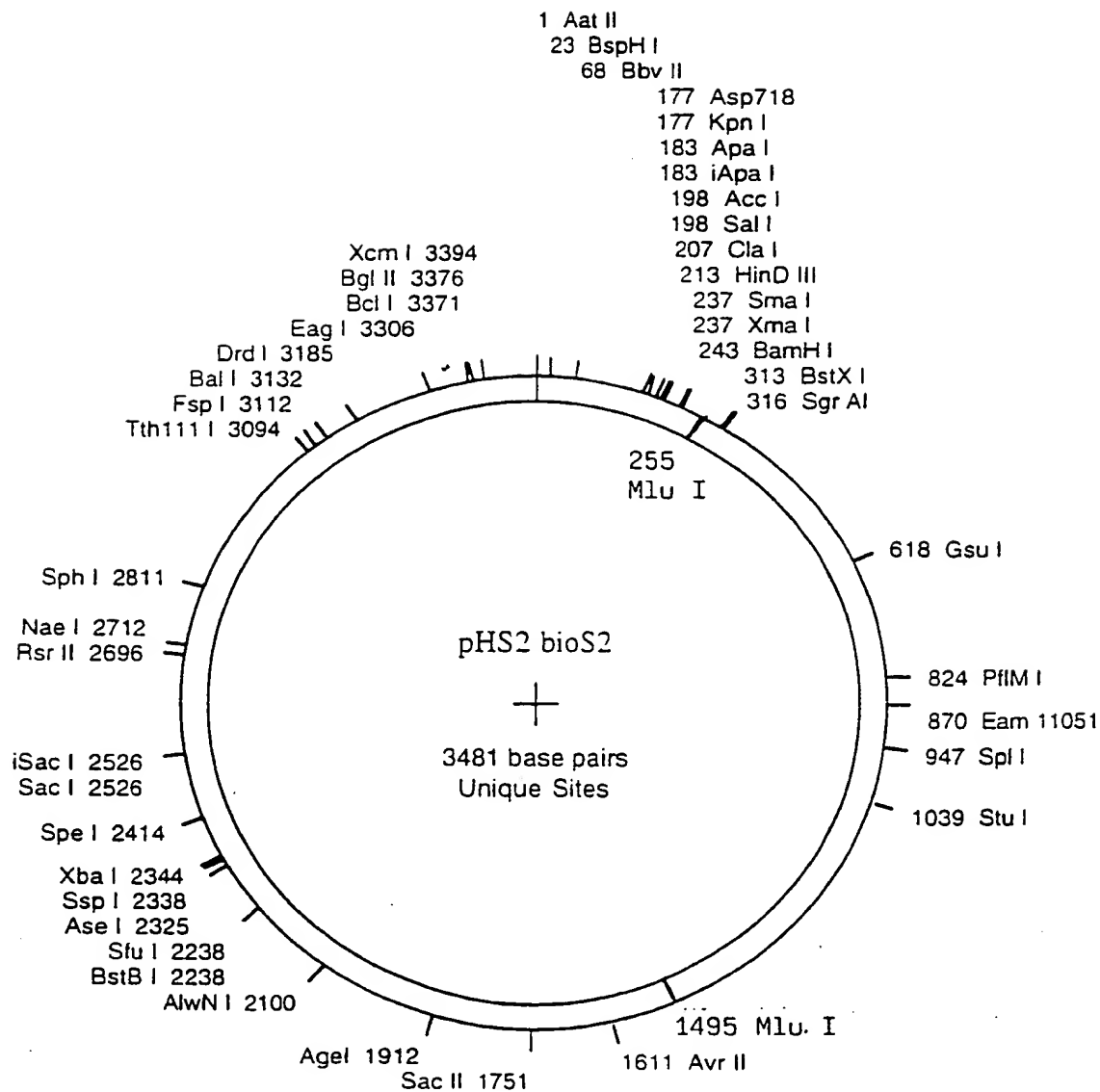
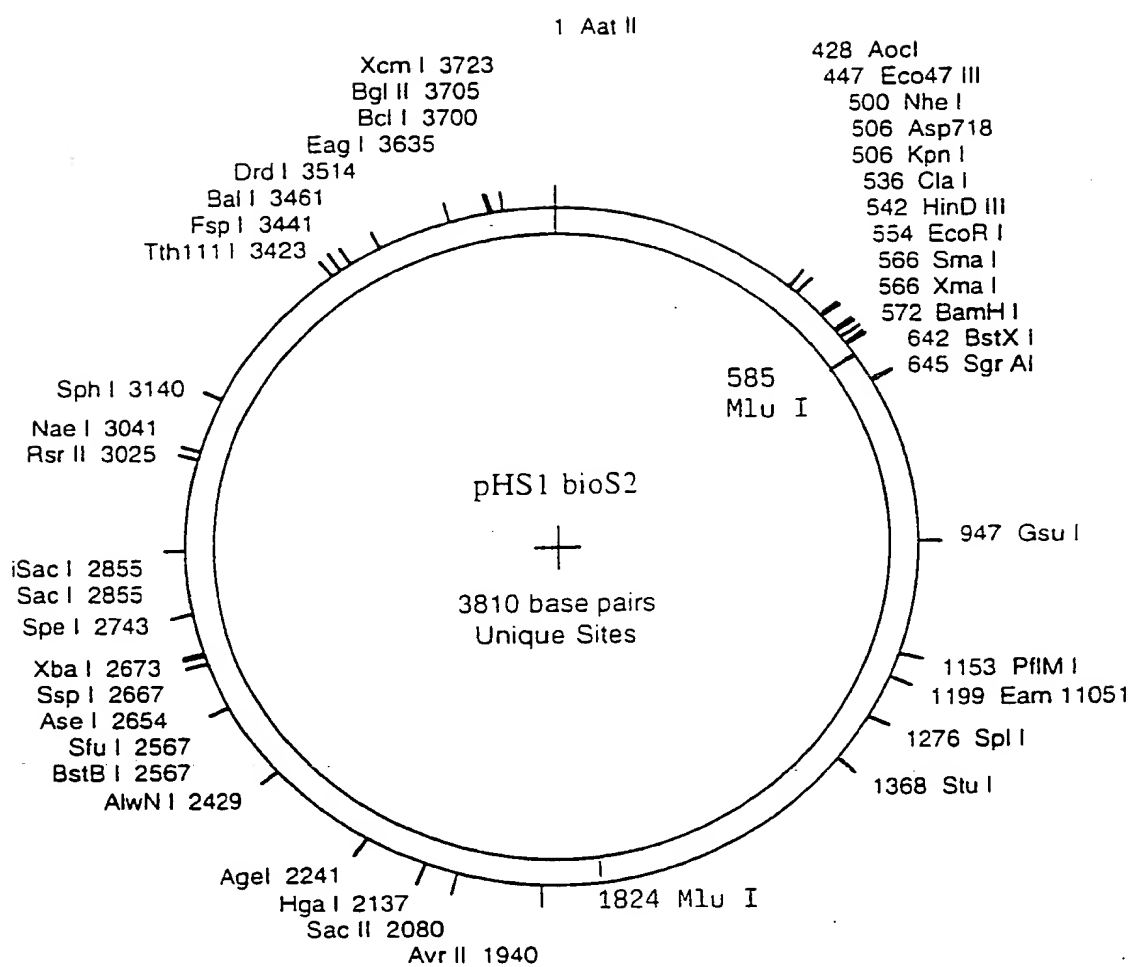


Figure 4



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung von Biotin

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1217 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- (B) STAMM: W3110

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..11

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 12..1217

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAGGAGTAC C ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG CAG TTT CGC GCC CAG TTT
Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe

1

5

10

50

CCC	GCA	CTA	CAG	GAT	GCG	GGC	GTC	TAT	CTC	GAC	AGC	GCC	GCG	ACC	GCG	98
Pro	Ala	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	
15						20					25					
CTT	AAA	CCT	GAA	GCC	GTG	GTT	GAA	GCC	ACC	CAA	CAG	TTT	TAC	AGT	CTG	146
Leu	Lys	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	Ser	Leu	
30					35					40					45	
AGC	GCC	GGA	AAC	GTC	CAT	CGC	AGC	CAG	TTT	GCC	GAA	GCC	CAA	CGC	CTG	194
Ser	Ala	Gly	Asn	Val	His	Arg	Ser	Gln	Phe	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	
			50						55					60		
ACC	GCG	CGT	TAT	GAA	GCT	GCA	CGA	GAG	AAA	GTG	GCG	CAA	TTA	CTG	AAT	242
Thr	Ala	Arg	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Leu	Asn	
			65					70					75			
GCA	CCG	GAT	GAT	AAA	ACT	ATC	GTC	TGG	ACG	CGC	GGC	ACC	ACT	GAA	TCC	290
Ala	Pro	Asp	Asp	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	
		80					85					90				
ATC	AAC	ATG	GTG	GCA	CAA	TGC	TAT	GCG	CGT	CCG	CGT	CTG	CAA	CCG	GCG	338
Ile	Asn	Met	Val	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ala	Arg	Pro	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	
95						100					105					
GAT	GAG	ATT	ATT	GTC	AGC	GTG	GCA	GAA	CAC	CAC	GCC	AAC	CTC	GTC	CCC	386
Asp	Glu	Ile	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Glu	His	His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	
110					115					120					125	
TGG	CTG	ATG	GTC	GCC	CAA	CAA	ACT	GGA	GCC	AAA	GTG	GTG	AAA	TTG	CCG	434
Trp	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	
			130						135					140		
CTT	AAT	GCG	CAG	CGA	CTG	CCG	GAT	GTC	GAT	TTG	TTG	CCA	GAA	CTG	ATT	482
Leu	Asn	Ala	Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	
			145					150					155			
ACT	CCC	CGT	AGT	CGG	ATT	CTG	GCG	TTG	GGT	CAG	ATG	TCG	AAC	GTT	ACT	530
Thr	Pro	Arg	Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	
		160					165					170				
GGC	GGT	TGC	CCG	GAT	CTG	GCG	CGA	GCG	ATT	ACC	TTT	GCT	CAT	TCA	GCC	578
Gly	Gly	Cys	Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	
175						180					185					
GGG	ATG	GTG	GTG	ATG	GTT	GAT	GGT	GCT	CAG	GGG	GCA	GTG	CAT	TTC	CCC	626
Gly	Met	Val	Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	
190					195					200					205	
GCG	GAT	GTT	CAG	CAA	CTG	GAT	ATT	GAT	TTC	TAT	GCT	TTT	TCA	GGT	CAC	674
Ala	Asp	Val	Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	
			210						215					220		

AAA CTG TAT GGC CCG ACA GGT ATC GGC GTG CTG TAT GGT AAA TCA GAA	722
Lys Leu Tyr Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu	
225 230 235	
CTG CTG GAG GCG ATG TCG CCC TGG CTG GGC GGC GGC AAA ATG GTT CAC	770
Leu Leu Glu Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His	
240 245 250	
GAA GTG AGT TTT GAC GGC TTC ACG ACT CAA TCT GCG CCG TGG AAA CTG	818
Glu Val Ser Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu	
255 260 265	
GAA GCT GGA ACG CCA AAT GTC GCT GGT GTC ATA GGA TTA AGC GCG GCG	866
Glu Ala Gly Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala	
270 275 280 285	
CTG GAA TGG CTG GCA GAT TAC GAT ATC AAC CAG GCC GAA AGC TGG AGC	914
Leu Glu Trp Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser	
290 295 300	
CGT AGC TTA GCA ACG CTG GCG GAA GAT GCG CTG GCG AAA CGT CCC GGC	962
Arg Ser Leu Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly	
305 310 315	
TTT CGT TCA TTC CGC TGC CAG GAT TCC AGC CTG CTG GCC TTT GAT TTT	1010
Phe Arg Ser Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe	
320 325 330	
GCT GGC GTT CAT CAT AGC GAT ATG GTG ACG CTG CTG GCG GAG TAC GGT	1058
Ala Gly Val His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly	
335 340 345	
ATT GCC CTG CGG GCC GGG CAG CAT TGC GCT CAG CCG CTA CTG GCA GAA	1106
Ile Ala Leu Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu	
350 355 360 365	
TTA GGC GTA ACC GGC ACA CTG CGC GCC TCT TTT GCG CCA TAT AAT ACA	1154
Leu Gly Val Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr	
370 375 380	
AAG AGT GAT GTG GAT GCG CTG GTG AAT GCC GTT GAC CGC GCG CTG GAA	1202
Lys Ser Asp Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu	
385 390 395	
TTA TTG GTG GAT TA	1217
Leu Leu Val Asp	
400	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 401 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Asn	Val	Phe	Asn	Pro	Ala	Gln	Phe	Arg	Ala	Gln	Phe	Pro	Ala	Leu
1				5					10					15	
Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Lys	Pro
		20					25						30		
Glu	Ala	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Gln	Gln	Phe	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly
		35					40					45			
Asn	Val	His	Arg	Ser	Gln	Phe	Ala	Glu	Ala	Gln	Arg	Leu	Thr	Ala	Arg
	50					55					60				
Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Glu	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Pro	Asp
65					70					75					80
Asp	Lys	Thr	Ile	Val	Trp	Thr	Arg	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Ile	Asn	Met
				85					90					95	
Val	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ala	Arg	Pro	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile
			100					105					110		
Ile	Val	Ser	Val	Ala	Glu	His	His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Trp	Leu	Met
		115					120					125			
Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala
		130				135					140				
Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg
145					150					155					160
Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Cys
				165					170					175	
Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	Gly	Met	Val
			180					185					190		
Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	Ala	Asp	Val
		195					200					205			
Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr
		210				215					220				
Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu
225					230					235					240
Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser
				245					250					255	

Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly
 260 265 270
 Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
 275 280 285
 Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
 290 295 300
 Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
 305 310 315 320
 Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335
 His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350
 Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 355 360 365
 Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380
 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400
 Asp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1233 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- (B) STAMM: W3110

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 19..1233

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE: 1..18

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AAAGAGGAGA AATTA	ACT	ATG	AAA	TTA	CCG	ATT	TAT	CTC	GAC	TAC	TCC	GCA	51
		Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ala	
		1				5					10		
ACC	ACG	CCG	GTG	GAC	CCG	CGT	GTT	GCC	GAG	AAA	ATG	ATG	99
Thr	Thr	Pro	Val	Asp	Pro	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Met	Met	
		15						20				25	
ACG	ATG	GAC	GGA	ACC	TTT	GGT	AAC	CCG	GCC	TCC	CGT	TCT	147
Thr	Met	Asp	Gly	Thr	Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	
		30					35				40		
GGC	TGG	CAG	GCT	GAA	GAA	GCG	GTA	GAT	ATC	GCC	CGT	AAT	195
Gly	Trp	Gln	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Asn	
	45					50					55		
GAT	CTG	GTC	GGC	GCT	GAT	CCG	CGT	GAA	ATC	GTC	TTT	ACC	243
Asp	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Pro	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	
	60				65					70			
ACC	GAA	TCT	GAC	AAC	CTG	GCG	ATC	AAA	GGT	GCA	GCC	AAC	291
Thr	Glu	Ser	Asp	Asn	Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Asn	
				80					85				
AAA	AAA	GGC	AAG	CAC	ATC	ATC	ACC	AGC	AAA	ACC	GAA	CAC	339
Lys	Lys	Gly	Lys	His	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Glu	His	
			95					100				105	
CTG	GAT	ACC	TGC	CGT	CAG	CTG	GAG	CGC	GAA	GGT	TTT	GAA	387
Leu	Asp	Thr	Cys	Arg	Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Glu	
		110					115					120	
CTG	GCA	CCG	CAG	CGT	AAC	GGC	ATT	ATC	GAC	CTG	AAA	GAA	435
Leu	Ala	Pro	Gln	Arg	Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Lys	Glu	
	125					130					135		
GCG	ATG	CGT	GAC	GAC	ACC	ATC	CTC	GTG	TCC	ATC	ATG	CAC	483
Ala	Met	Arg	Asp	Asp	Thr	Ile	Leu	Val	Ser	Ile	Met	His	
	140				145					150			
GAA	ATC	GGC	GTG	GTG	CAG	GAT	ATC	GCG	GCT	ATC	GGC	GAA	531
Glu	Ile	Gly	Val	Val	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	
			160						165				
GCT	CGT	GGC	ATT	ATC	TAT	CAC	GTT	GAT	GCA	ACC	CAG	AGC	579
Ala	Arg	Gly	Ile	Ile	Tyr	His	Val	Asp	Ala	Thr	Gln	Ser	
			175					180					
												185	

CTG	CCT	ATC	GAC	CTG	AGC	CAG	TTG	AAA	GTT	GAC	CTG	ATG	TCT	TTC	TCC	627
Leu	Pro	Ile	Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	Lys	Val	Asp	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	
		190					195					200				
GGT	CAC	AAA	ATC	TAT	GGC	CCG	AAA	GGT	ATC	GGT	GCG	CTG	TAT	GTA	CGT	675
Gly	His	Lys	Ile	Tyr	Gly	Pro	Lys	Gly	Ile	Gly	Ala	Leu	Tyr	Val	Arg	
		205				210					215					
CGT	AAA	CCG	CGC	GTA	CGC	ATC	GAA	GCG	CAA	ATG	CAC	GGC	GGC	GGT	CAC	723
Arg	Lys	Pro	Arg	Val	Arg	Ile	Glu	Ala	Gln	Met	His	Gly	Gly	Gly	His	
220					225					230					235	
GAG	CGC	GGT	ATG	CGT	TCC	GGC	ACT	CTG	CCT	GTT	CAC	CAG	ATC	GTC	GGA	771
Glu	Arg	Gly	Met	Arg	Ser	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	His	Gln	Ile	Val	Gly	
				240					245					250		
ATG	GGC	GAG	GCC	TAT	CGC	ATC	GCA	AAA	GAA	GAG	ATG	GCG	ACC	GAG	ATG	819
Met	Gly	Glu	Ala	Tyr	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Glu	Met	Ala	Thr	Glu	Met	
			255					260					265			
GAA	CGT	CTG	CGC	GGC	CTG	CGT	AAC	CGT	CTG	TGG	AAC	GGC	ATC	AAA	GAT	867
Glu	Arg	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Asn	Arg	Leu	Trp	Asn	Gly	Ile	Lys	Asp	
		270					275					280				
ATC	GAA	GAA	GTT	TAC	CTG	AAC	GGT	GAC	CTG	GAA	CAC	GGT	GCG	CCG	AAC	915
Ile	Glu	Glu	Val	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	Leu	Glu	His	Gly	Ala	Pro	Asn	
		285					290					295				
ATT	CTC	AAC	GTC	AGC	TTC	AAC	TAC	GTT	GAA	GGT	GAG	TCG	CTG	ATT	ATG	963
Ile	Leu	Asn	Val	Ser	Phe	Asn	Tyr	Val	Glu	Gly	Glu	Ser	Leu	Ile	Met	
300						305				310					315	
GCG	CTG	AAA	GAC	CTC	GCA	GTT	TCT	TCA	GGT	TCC	GCC	TGT	ACG	TCA	GCA	1011
Ala	Leu	Lys	Asp	Leu	Ala	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Cys	Thr	Ser	Ala	
				320						325					330	
AGC	CTC	GAA	CCG	TCC	TAC	GTG	CTG	CGC	GCG	CTG	GGG	CTG	AAC	GAC	GAG	1059
Ser	Leu	Glu	Pro	Ser	Tyr	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Asn	Asp	Glu	
			335					340					345			
CTG	GCA	CAT	AGC	TCT	ATC	CGT	TTC	TCT	TTA	GGT	CGT	TTT	ACT	ACT	GAA	1107
Leu	Ala	His	Ser	Ser	Ile	Arg	Phe	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Thr	Thr	Glu	
		350					355					360				
GAA	GAG	ATC	GAC	TAC	ACC	ATC	GAG	TTA	GTT	CGT	AAA	TCC	ATC	GGT	CGT	1155
Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Ser	Ile	Gly	Arg	
		365					370				375					
CTG	CGT	GAC	CTT	TCT	CCG	CTG	TGG	GAA	ATG	TAC	AAG	CAG	GGC	GTG	GAT	1203
Leu	Arg	Asp	Leu	Ser	Pro	Leu	Trp	Glu	Met	Tyr	Lys	Gln	Gly	Val	Asp	
380						385				390					395	

CTG AAC AGC ATC GAA TGG GCT CAT CAT TA
 Leu Asn Ser Ile Glu Trp Ala His His
 400 405

1233

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 404 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ala	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	1	5	10	15
Pro	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Met	Met	Gln	Phe	Met	Thr	Met	Asp	Gly	Thr	20	25	30	
Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Arg	Phe	Gly	Trp	Gln	Ala	Glu	35	40	45	
Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Ala	50	55	60	
Asp	Pro	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Ser	Asp	Asn	65	70	75	80
Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Tyr	Gln	Lys	Lys	Gly	Lys	His	85	90	95	
Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Cys	Arg	100	105	110	
Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	Gln	Arg	115	120	125	
Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Met	Arg	Asp	Asp	130	135	140	
Thr	Ile	Leu	Val	Ser	Ile	Met	His	Val	Asn	Asn	Glu	Ile	Gly	Val	Val	145	150	155	160
Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Met	Cys	Arg	Ala	Arg	Gly	Ile	Ile	165	170	175	
Tyr	His	Val	Asp	Ala	Thr	Gln	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	Pro	Ile	Asp	Leu	180	185	190	
Ser	Gln	Leu	Lys	Val	Asp	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Ile	Tyr	195	200	205	

Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val
 210 215 220
 Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg
 225 230 235 240
 Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr
 245 250 255
 Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly
 260 265 270
 Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr
 275 280 285
 Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser
 290 295 300
 Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu
 305 310 315 320
 Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser
 325 330 335
 Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser
 340 345 350
 Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr
 355 360 365
 Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser
 370 375 380
 Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu
 385 390 395 400
 Trp Ala His His

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3794 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pHS1bioS1

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 601..1806

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GACGTCTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACACAC AGGGCCCTCG GACACCGAGG	60
AGAATGTCAA GAGGCGAACA CACAACGTCT TGGAGCGCCA GAGGAGGAAC GAGCTAA AAC	120
GGAGCTTTTT TGCCCTGCGT GACCAGATCC CGGAGTTGGA AAACAATGAA AAGGCCCCCA	180
AGGTAGTTAT CCTTAAAAA GCCACAGCAT ACATCCTGTC CGTCCAAGCA GAGGAGCAAA	240
AGCTCATTTT TGAAGAGGAC TTGTTGCGGA AACGACGAGA ACAGTTGAAA CACAACTTG	300
AACAGCTACG GAACTCTTGT GCGTAAGGAA AAGTAAGGAA AACGATTCCT TCTAACAGAA	360
ATGTCCTGAG CAATCACCTA TGAAGTGTG ACTCGAGATA GCATTTTTAT CCATAAGATT	420
AGCCGATCCT AAGGTTTACA ATTGTGAGCG CTCACAATTA TGATAGATTC AATTGTGAGC	480
GGATAACAAT TTCACACACG CTAGCGGTAC CGGGCCCCC CTCGAGGTCG ACGGTATCGA	540
TAAGCTTGAT ATCGAATTCC TGCAGCCCGG GGGATCCCAT GGTACGCGTC GAGGAGTACC	600
ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG CAG TTT CGC GCC CAG TTT CCC GCA CTA	648
Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu	
1 5 10 15	
CAG GAT GCG GGC GTC TAT CTC GAC AGC GCC GCG ACC GCG CTT AAA CCT	696
Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro	
20 25 30	
GAA GCC GTG GTT GAA GCC ACC CAA CAG TTT TAC AGT CTG AGC GCC GGA	744
Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly	
35 40 45	
AAC GTC CAT CGC AGC CAG TTT GCC GAA GCC CAA CGC CTG ACC GCG CGT	792
Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg	
50 55 60	
TAT GAA GCT GCA CGA GAG AAA GTG GCG CAA TTA CTG AAT GCA CCG GAT	840
Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp	
65 70 75 80	
GAT AAA ACT ATC GTC TGG ACG CGC GGC ACC ACT GAA TCC ATC AAC ATG	888
Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met	
85 90 95	

GTG	GCA	CAA	TGC	TAT	GCG	CGT	CCG	CGT	CTG	CAA	CCG	GGC	GAT	GAG	ATT	936
Val	Ala	Gln	Cys	Tyr	Ala	Arg	Pro	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile	
			100					105					110			
ATT	GTC	AGC	GTG	GCA	GAA	CAC	CAC	GCC	AAC	CTC	GTC	CCC	TGG	CTG	ATG	984
Ile	Val	Ser	Val	Ala	Glu	His	His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Trp	Leu	Met	
			115					120					125			
GTC	GCC	CAA	CAA	ACT	GGA	GCC	AAA	GTG	GTG	AAA	TTG	CCG	CTT	AAT	GCG	1032
Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala	
			130				135					140				
CAG	CGA	CTG	CCG	GAT	GTC	GAT	TTG	TTG	CCA	GAA	CTG	ATT	ACT	CCC	CGT	1080
Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg	
					145		150				155				160	
AGT	CGG	ATT	CTG	GCG	TTG	GGT	CAG	ATG	TCG	AAC	GTT	ACT	GGC	GGT	TGC	1128
Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Cys	
				165					170					175		
CCG	GAT	CTG	GCG	CGA	GCG	ATT	ACC	TTT	GCT	CAT	TCA	GCC	GGG	ATG	GTG	1176
Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	Gly	Met	Val	
			180					185					190			
GTG	ATG	GTT	GAT	GGT	GCT	CAG	GGG	GCA	GTG	CAT	TTC	CCC	GCG	GAT	GTT	1224
Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	Ala	Asp	Val	
			195				200					205				
CAG	CAA	CTG	GAT	ATT	GAT	TTC	TAT	GCT	TTT	TCA	GGT	CAC	AAA	CTG	TAT	1272
Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr	
			210				215					220				
GGC	CCG	ACA	GGT	ATC	GGC	GTG	CTG	TAT	GGT	AAA	TCA	GAA	CTG	CTG	GAG	1320
Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu	
			225			230				235					240	
GCG	ATG	TCG	CCC	TGG	CTG	GGC	GGC	GGC	AAA	ATG	GTT	CAC	GAA	GTG	AGT	1368
Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser	
				245					250					255		
TTT	GAC	GGC	TTC	ACG	ACT	CAA	TCT	GCG	CCG	TGG	AAA	CTG	GAA	GCT	GGA	1416
Phe	Asp	Gly	Phe	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Pro	Trp	Lys	Leu	Glu	Ala	Gly	
			260					265					270			
ACG	CCA	AAT	GTC	GCT	GGT	GTC	ATA	GGA	TTA	AGC	GCG	GCG	CTG	GAA	TGG	1464
Thr	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Glu	Trp	
			275				280					285				
CTG	GCA	GAT	TAC	GAT	ATC	AAC	CAG	GCC	GAA	AGC	TGG	AGC	CGT	AGC	TTA	1512
Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asn	Gln	Ala	Glu	Ser	Trp	Ser	Arg	Ser	Leu	
			290				295				300					

GCA ACG CTG GCG GAA GAT GCG CTG GCG AAA CGT CCC GGC TTT CGT TCA	1560
Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser	
305 310 315 320	
TTC CGC TGC CAG GAT TCC AGC CTG CTG GCC TTT GAT TTT GCT GGC GTT	1608
Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val	
325 330 335	
CAT CAT AGC GAT ATG GTG ACG CTG CTG GCG GAG TAC GGT ATT GCC CTG	1656
His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu	
340 345 350	
CGG GCC GGG CAG CAT TGC GCT CAG CCG CTA CTG GCA GAA TTA GGC GTA	1704
Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val	
355 360 365	
ACC GGC ACA CTG CGC GCC TCT TTT GCG CCA TAT AAT ACA AAG AGT GAT	1752
Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp	
370 375 380	
GTG GAT GCG CTG GTG AAT GCC GTT GAC CGC GCG CTG GAA TTA TTG GTG	1800
Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val	
385 390 395 400	
GAT TAAACGCGTG CTAGAGGCAT CAAATAAAAC GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC	1853
Asp	

TGGGCCTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTCG GTGAACGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG	-1913
CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT ATATTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT ACGCTCGGTC	1973
GTTCGACTGC GGCGAGCGGA AATGGCTTAC GAACGGGGCG GAGATTTCCT GGAAGATGCC	2033
AGGAAGATAC TTAACAGGGA AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA GCCGTTTTTC CATAGGCTCC	2093
GCCCCCTGA CAAGCATCAC GAAATCTGAC GCTCAAATCA GTGGTGGCGA AACCCGACAG	2153
GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCCTG	2213
CCTTTCGGTT TACCGGTGTC ATTCCGCTGT TATGGCCGCG TTTGTCTCAT TCCACGCCTG	2273
ACACTCAGTT CCGGGTAGGC AGTTCGCTCC AAGCTGGACT GTATGCACGA ACCCCCCGTT	2333
CAGTCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGAAAGACAT	2393
GCAAAAGCAC CACTGGCAGC AGCCAETGGT AATTGATTTA GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC	2453
ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA CTGAAAGGAC AAGTTTTGGT GACTGCGCTC CTCCAAGCCA	2513
GTTACCTCGG TTCAAAGAGT TGGTAGCTCA GAGAACCTTC GAAAAACCGC CCTGCAAGGC	2573
GGTTTTTTTCG TTTTCAGAGC AAGAGATTAC GCGCAGACCA AAACGATCTC AAGAAGATCA	2633
TCTTATTAAT CAGATAAAAT ATTTCTAGAT TTCAGTGCAA TTTATCTCTT CAAATGTAGC	2693

```

ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT GTTACTAGTG CTTGGATTCT CACCAATAAA 2753
AAACGCCCCGG CGGCAACCGA GCGTTCTGAA CAAATCCAGA TGGAGTTCTG AGGTCATTAC 2813
TGGATCTATC AACAGGAGTC CAAGCGAGCT CTCGAACCCC AGAGTCCCGC TCAGAAGAAC 2873
TCGTCAAGAA GGCGATAGAA GGCGATGCGC TGCGAATCGG GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC 2933
ACGAGGAAGC GGTCAGCCCCA TTCGCCGCCA AGCTCTTCAG CAATATCACG GGTAGCCAAC 2993
GCTATGTCCT GATAGCGGTC CGCCACACCC AGCCGGCCAC AGTCGATGAA TCCAGAAAAG 3053
CGGCCATTTT CCACCATGAT ATTCGGCAAG CAGGCATCGC CATGGGTCAC GACGAGATCC 3113
TCGCCGTCGG GCATGCGCGC CTTGAGCCTG GCGAACAGTT CGGCTGGCGC GAGCCCCTGA 3173
TGCTCTTCGT CCAGATCATC CTGATCGACA AGACCGGCTT CCATCCGAGT ACGTGCTCGC 3233
TCGATGCGAT GTTTCGCTTG GTGGTCGAAT GGGCAGGTAG CCGGATCAAG CGTATGCAGC 3293
CGCCGCATTG CATCAGCCAT GATGGATACT TTCTCGGCAG GAGCAAGGTG AGATGACAGG 3353
AGATCCTGCC CCGGCACTTC GCCCAATAGC AGCCAGTCCC TTCCCGCTTC AGTGACAACG 3413
TCGAGCACAG CTGCGCAAGG AACGCCCCGTC GTGGCCAGCC ACGATAGCCG CGCTGCCTCG 3473
TCCTGCAGTT CATTTCAGGGC ACCGGACAGG TCGGTCTTGA CAAAAAGAAC CGGGCGCCCC 3533
TGCGCTGACA GCCGGAACAC GGCGGCATCA GAGCAGCCGA TTGTCTGTTG TGCCCAGTCA 3593
TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC GGAGAACCTG CGTGCAATCC ATCTTGTTCA 3653
ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT TGATCAGATC TTGATCCCCT GCGCCATCAG 3713
ATCCTTGGCG GCAAGAAAGC CATCCAGTTT ACTTTGCAGG GCTTCCCAAC CTTACCAGAG 3773
GGCGCCCCAG CTGGCAATTC C 3794

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 401 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1             5             10             15
Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
      20             25             30

```


Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
 35 40 45
 Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
 50 55 60
 Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met
 85 90 95
 Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile
 100 105 110
 Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met
 115 120 125
 Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala
 130 135 140
 Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg
 145 150 155 160
 Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys
 165 170 175
 Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val
 180 185 190
 Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val
 195 200 205
 Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu
 225 230 235 240
 Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser
 245 250 255
 Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly
 260 265 270
 Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
 275 280 285
 Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
 290 295 300
 Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
 305 310 315 320

Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335
 His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350
 Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 355 360 365
 Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380
 Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400
 Asp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3810 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pHS1bioS2

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 608..1822

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GACGTCTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACACAC AGGGCCCTCG GACACCGAGG	60
AGAATGTCAA GAGGCGAACA CACAACGTCT TGGAGCGCCA GAGGAGGAAC GAGCTAAAAC	120
GGAGCTTTTT TGCCCTGCGT GACCAGATCC CGGAGTTGGA AAACAATGAA AAGGCCCCCA	180
AGGTAGTTAT CCTTAAAAAA GCCACAGCAT ACATCCTGTC CGTCCAAGCA GAGGAGCAAA	240
AGCTCATTTT TGAAGAGGAC TTGTTGCGGA AACGACGAGA ACAGTTGAAA CACAACTTG	300
AACAGCTACG GAACTCTTGT GCGTAAGGAA AAGTAAGGAA AACGATTCCT TCTAACAGAA	360
ATGTCCTGAG CAATCACCTA TGAAGTGTG ACTCGAGATA GCATTTTAT CCATAAGATT	420

AGCCGATCCT	AAGGTTTACA	ATTGTGAGCG	CTCACAATTA	TGATAGATTC	AATTGTGAGC	480										
GGATAACAAT	TTCACACACG	CTAGCGGTAC	CGGGCCCCCC	CTCGAGGTCG	ACGGTATCGA	540										
TAAGCTTGAT	ATCGAATTCC	TGCAGCCCCG	GGGATCCCAT	GGTACGCGTA	AAGAGGAGAA	600										
ATTAACT	ATG	AAA	TTA	CCG	ATT	TAT	CTC	GAC	TAC	TCC	GCA	ACC	ACG	CCG	649	
	Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ala	Thr	Thr	Pro		
	1				5					10						
GTG	GAC	CCG	CGT	GTT	GCC	GAG	AAA	ATG	ATG	CAG	TTT	ATG	ACG	ATG	GAC	697
Val	Asp	Pro	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Met	Met	Gln	Phe	Met	Thr	Met	Asp	
15					20					25					30	
GGA	ACC	TTT	GGT	AAC	CCG	GCC	TCC	CGT	TCT	CAC	CGT	TTC	GGC	TGG	CAG	745
Gly	Thr	Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Arg	Phe	Gly	Trp	Gln	
				35					40					45		
GCT	GAA	GAA	GCG	GTA	GAT	ATC	GCC	CGT	AAT	CAG	ATT	GCC	GAT	CTG	GTC	793
Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	
			50					55					60			
GGC	GCT	GAT	CCG	CGT	GAA	ATC	GTC	TTT	ACC	TCT	GGT	GCA	ACC	GAA	TCT	841
Gly	Ala	Asp	Pro	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Ser	
		65					70					75				
GAC	AAC	CTG	GCG	ATC	AAA	GGT	GCA	GCC	AAC	TTT	TAT	CAG	AAA	AAA	GGC	889
Asp	Asn	Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Tyr	Gln	Lys	Lys	Gly	
	80					85					90					
AAG	CAC	ATC	ATC	ACC	AGC	AAA	ACC	GAA	CAC	AAA	GCG	GTA	CTG	GAT	ACC	937
Lys	His	Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	
	95				100					105					110	
TGC	CGT	CAG	CTG	GAG	CGC	GAA	GGT	TTT	GAA	GTC	ACC	TAC	CTG	GCA	CCG	985
Cys	Arg	Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	
			115						120					125		
CAG	CGT	AAC	GGC	ATT	ATC	GAC	CTG	AAA	GAA	CTT	GAA	GCA	GCG	ATG	CGT	1033
Gln	Arg	Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Met	Arg	
			130					135					140			
GAC	GAC	ACC	ATC	CTC	GTG	TCC	ATC	ATG	CAC	GTA	AAT	AAC	GAA	ATC	GGC	1081
Asp	Asp	Thr	Ile	Leu	Val	Ser	Ile	Met	His	Val	Asn	Asn	Glu	Ile	Gly	
		145					150					155				
GTG	GTG	CAG	GAT	ATC	GCG	GCT	ATC	GGC	GAA	ATG	TGC	CGT	GCT	CGT	GGC	1129
Val	Val	Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Met	Cys	Arg	Ala	Arg	Gly	
	160					165					170					
ATT	ATC	TAT	CAC	GTT	GAT	GCA	ACC	CAG	AGC	GTG	GGT	AAA	CTG	CCT	ATC	1177
Ile	Ile	Tyr	His	Val	Asp	Ala	Thr	Gln	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	Pro	Ile	
	175				180					185					190	

GAC	CTG	AGC	CAG	TTG	AAA	GTT	GAC	CTG	ATG	TCT	TTC	TCC	GGT	CAC	AAA	1225
Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	Lys	Val	Asp	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Gly	His	Lys	
				195					200						205	
ATC	TAT	GGC	CCG	AAA	GGT	ATC	GGT	GCG	CTG	TAT	GTA	CGT	CGT	AAA	CCG	1273
Ile	Tyr	Gly	Pro	Lys	Gly	Ile	Gly	Ala	Leu	Tyr	Val	Arg	Arg	Lys	Pro	
			210					215						220		
CGC	GTA	CGC	ATC	GAA	GCG	CAA	ATG	CAC	GGC	GGC	GGT	CAC	GAG	CGC	GGT	1321
Arg	Val	Arg	Ile	Glu	Ala	Gln	Met	His	Gly	Gly	Gly	His	Glu	Arg	Gly	
		225					230					235				
ATG	CGT	TCC	GGC	ACT	CTG	CCT	GTT	CAC	CAG	ATC	GTC	GGA	ATG	GGC	GAG	1369
Met	Arg	Ser	Gly	Thr	Leu	Pro	Val	His	Gln	Ile	Val	Gly	Met	Gly	Glu	
	240					245					250					
GCC	TAT	CGC	ATC	GCA	AAA	GAA	GAG	ATG	GCG	ACC	GAG	ATG	GAA	CGT	CTG	1417
Ala	Tyr	Arg	Ile	Ala	Lys	Glu	Glu	Met	Ala	Thr	Glu	Met	Glu	Arg	Leu	
255					260				265						270	
CGC	GGC	CTG	CGT	AAC	CGT	CTG	TGG	AAC	GGC	ATC	AAA	GAT	ATC	GAA	GAA	1465
Arg	Gly	Leu	Arg	Asn	Arg	Leu	Trp	Asn	Gly	Ile	Lys	Asp	Ile	Glu	Glu	
				275				280						285		
GTT	TAC	CTG	AAC	GGT	GAC	CTG	GAA	CAC	GGT	GCG	CCG	AAC	ATT	CTC	AAC	1513
Val	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	Leu	Glu	His	Gly	Ala	Pro	Asn	Ile	Leu	Asn	
			290					295					300			
GTC	AGC	TTC	AAC	TAC	GTT	GAA	GGT	GAG	TCG	CTG	ATT	ATG	GCG	CTG	AAA	1561
Val	Ser	Phe	Asn	Tyr	Val	Glu	Gly	Glu	Ser	Leu	Ile	Met	Ala	Leu	Lys	
		305					310					315				
GAC	CTC	GCA	GTT	TCT	TCA	GGT	TCC	GCC	TGT	ACG	TCA	GCA	AGC	CTC	GAA	1609
Asp	Leu	Ala	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Cys	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Glu	
	320					325					330					
CCG	TCC	TAC	GTG	CTG	CGC	GCG	CTG	GGG	CTG	AAC	GAC	GAG	CTG	GCA	CAT	1657
Pro	Ser	Tyr	Val	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Asn	Asp	Glu	Leu	Ala	His	
335					340					345					350	
AGC	TCT	ATC	CGT	TTC	TCT	TTA	GGT	CGT	TTT	ACT	ACT	GAA	GAA	GAG	ATC	1705
Ser	Ser	Ile	Arg	Phe	Ser	Leu	Gly	Arg	Phe	Thr	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	
				355				360						365		
GAC	TAC	ACC	ATC	GAG	TTA	GTT	CGT	AAA	TCC	ATC	GGT	CGT	CTG	CGT	GAC	1753
Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Ser	Ile	Gly	Arg	Leu	Arg	Asp	
			370					375					380			
CTT	TCT	CCG	CTG	TGG	GAA	ATG	TAC	AAG	CAG	GGC	GTG	GAT	CTG	AAC	AGC	1801
Leu	Ser	Pro	Leu	Trp	Glu	Met	Tyr	Lys	Gln	Gly	Val	Asp	Leu	Asn	Ser	
		385					390					395				

ATC GAA TGG GCT CAT CAT TAAACGCGTG CTAGAGGCAT CAAATAAAAC 1849
 Ile Glu Trp Ala His His
 400 405

GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC TGGGCCCTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTCG GTGAACGCTC 1909
 TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT ATATTCCGCT TCCTCGCTCA 1969
 CTGACTCGCT ACGCTCGGTC GTTCGACTGC GGCGAGCGGA AATGGCTTAC GAACGGGGCG 2029
 GAGATTTCTT GGAAGATGCC AGGAAGATAC TTAACAGGGA AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA 2089
 GCCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CAAGCATCAC GAAATCTGAC GCTCAAATCA 2149
 GTGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT 2209
 CGTGCGCTCT CCTGTTCTTG CCTTTCGGTT TACCGGTGTC ATTCCGCTGT TATGGCCGCG 2269
 TTTGTCTCAT TCCACGCCTG AACTCAGTT CCGGGTAGGC AGTTCGCTCC AAGCTGGACT 2329
 GTATGCACGA ACCCCCCGTT CAGTCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG 2389
 AGTCCAACCC GGAAAGACAT GCAAAAGCAC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AATTGATTTA 2449
 GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA CTGAAAGGAC AAGTTTTGGT 2509
 GACTGCGCTC CTCCAAGCCA GTTACCTCGG TTCAAAGAGT TGGTAGCTCA GAGAACCTTC 2569
 GAAAAACCGC CCTGCAAGGC GGTTTTTTTCG TTTTCAGAGC AAGAGATTAC GCGCAGACCA 2629
 AAACGATCTC AAGAAGATCA TCTTATTAAT CAGATAAAAT ATTTCTAGAT TTCAGTGCAA 2689
 TTTATCTCTT CAAATGTAGC ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT GTTACTAGTG 2749
 CTTGGATTCT CACCAATAAA AAACGCCCCG CGGCAACCGA GCGTTCTGAA CAAATCCAGA 2809
 TGGAGTTCTG AGGTCATTAC TGGATCTATC AACAGGAGTC CAAGCGAGCT CTCGAACCCC 2869
 AGAGTCCCGC TCAGAAGAAC TCGTCAAGAA GGCGATAGAA GGCGATGCGC TGCGAATCGG 2929
 GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC ACGAGGAAGC GGTCAGCCCA TTCGCCGCCA AGCTCTTCAG 2989
 CAATATCAGG GGTAGCCAAC GCTATGTCCT GATAGCGGTC CGCCACACCC AGCCGGCCAC 3049
 AGTCGATGAA TCCAGAAAAG CGGCCATTTT CCACCATGAT ATTCGGCAAG CAGGCATCGC 3109
 CATGGGTCAC GACGAGATCC TCGCCGTCGG GCATGCGCGC CTTGAGCCTG GCGAACAGTT 3169
 CGGCTGGCGC GAGCGGCTGA TGCTCTTCGT CCAGATCATC CTGATCGACA AGACCGGCTT 3229
 CCATCCGAGT ACGTGCTCGC TCGATGCGAT GTTTCGCTTG GTGGTCGAAT GGGCAGGTAG 3289
 CCGGATCAAG CGTATGCAGC CGCCGCATTG CATCAGCCAT GATGGATACT TTCTCGGCAG 3349
 GAGCAAGGTG AGATGACAGG AGATCCTGCC CCGGCACTTC GCCCAATAGC AGCCAGTCCC 3409
 TTCCCGCTTC AGTGACAACG TCGAGCACAG CTGCGCAAGG AACGCCCGTC GTGGCCAGCC 3469

ACGATAGCCG CGCTGCCTCG TCCTGCAGTT CATTCAGGGC ACCGGACAGG TCGGTCTTGA 3529
 CAAAAAGAAC CGGGCGCCCC TGCCTGACA GCCGGAACAC GGCGGCATCA GAGCAGCCGA 3589
 TTGTCTGTTG TGCCAGTCA TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC GGAGAACCTG 3649
 CGTGCAATCC ATCTTGTTCA ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT TGATCAGATC 3709
 TTGATCCCCT GCGCCATCAG ATCCTTGCG GCAAGAAAGC CATCCAGTTT ACTTTGCAGG 3769
 GCTTCCCAAC CTTACCAGAG GGCGCCCCAG CTGGCAATTC C 3810

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 404 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met	Lys	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Ser	Ala	Thr	Thr	Pro	Val	Asp	1	5	10	15
Pro	Arg	Val	Ala	Glu	Lys	Met	Met	Gln	Phe	Met	Thr	Met	Asp	Gly	Thr	20	25	30	
Phe	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	His	Arg	Phe	Gly	Trp	Gln	Ala	Glu	35	40	45	
Glu	Ala	Val	Asp	Ile	Ala	Arg	Asn	Gln	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Ala	50	55	60	
Asp	Pro	Arg	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Ser	Asp	Asn	65	70	75	80
Leu	Ala	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Asn	Phe	Tyr	Gln	Lys	Lys	Gly	Lys	His	85	90	95	
Ile	Ile	Thr	Ser	Lys	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	Cys	Arg	100	105	110	
Gln	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	Gln	Arg	115	120	125	
Asn	Gly	Ile	Ile	Asp	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Met	Arg	Asp	Asp	130	135	140	
Thr	Ile	Leu	Val	Ser	Ile	Met	His	Val	Asn	Asn	Glu	Ile	Gly	Val	Val	145	150	155	160
Gln	Asp	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Met	Cys	Arg	Ala	Arg	Gly	Ile	Ile	165	170	175	

Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu
 180 185 190
 Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr
 195 200 205
 Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val
 210 215 220
 Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg
 225 230 235 240
 Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr
 245 250 255
 Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly
 260 265 270
 Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr
 275 280 285
 Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser
 290 295 300
 Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu
 305 310 315 320
 Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser
 325 330 335
 Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser
 340 345 350
 Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr
 355 360 365
 Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser
 370 375 380
 Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu
 385 390 395 400
 Trp Ala His His

(2.) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3465 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pHS2bioS1

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 272..1477

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG	60
CCCTTTCGTC TTCACCTCGA GTCCCTATCA GTGATAGAGA TTGACATCCC TATCAGTGAT	120
AGAGATACTG AGCACATCAG CAGGACGCAC TGACCGAATT CATTAAAGAG GAGAAAGGTA	180
CCGGGCCCCC CCTCGAGGTC GACGGTATCG ATAAGCTTGA TATCGAATTC CTGCAGCCCG	240
GGGGATCCCA TGGTACGCGT CGAGGAGTAC C ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG	292
Met Asn Val Phe Asn Pro Ala	
1 5	
CAG TTT CGC GCC CAG TTT CCC GCA CTA CAG GAT GCG GGC GTC TAT CTC	340
Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu	
10 15 20	
GAC AGC GCC GCG ACC GCG CTT AAA CCT GAA GCC GTG GTT GAA GCC ACC	388
Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro Glu Ala Val Val Glu Ala Thr	
25 30 35	
CAA CAG TTT TAC AGT CTG AGC GCC GGA AAC GTC CAT CGC AGC CAG TTT	436
Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly Asn Val His Arg Ser Gln Phe	
40 45 50 55	
GCC GAA GCC CAA CGC CTG ACC GCG CGT TAT GAA GCT GCA CGA GAG AAA	484
Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys	
60 65 70	
GTG GCG CAA TTA CTG AAT GCA CCG GAT GAT AAA ACT ATC GTC TGG ACG	532
Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr	
75 80 85	
CGC GGC ACC ACT GAA TCC ATC AAC ATG GTG GCA CAA TGC TAT GCG CGT	580
Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg	
90 95 100	
CCG CGT CTG CAA CCG GGC GAT GAG ATT ATT GTC AGC GTG GCA GAA CAC	628
Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile Ile Val Ser Val Ala Glu His	
105 110 115	

CAC	GCC	AAC	CTC	GTC	CCC	TGG	CTG	ATG	GTC	GCC	CAA	CAA	ACT	GGA	GCC	676
His	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Trp	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Gln	Thr	Gly	Ala	
120					125					130					135	
AAA	GTG	GTG	AAA	TTG	CCG	CTT	AAT	GCG	CAG	CGA	CTG	CCG	GAT	GTC	GAT	724
Lys	Val	Val	Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Ala	Gln	Arg	Leu	Pro	Asp	Val	Asp	
				140					145						150	
TTG	TTG	CCA	GAA	CTG	ATT	ACT	CCC	CGT	AGT	CGG	ATT	CTG	GCG	TTG	GGT	772
Leu	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg	Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	
			155					160							165	
CAG	ATG	TCG	AAC	GTT	ACT	GGC	GGT	TGC	CCG	GAT	CTG	GCG	CGA	GCG	ATT	820
Gln	Met	Ser	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Cys	Pro	Asp	Leu	Ala	Arg	Ala	Ile	
		170					175					180				
ACC	TTT	GCT	CAT	TCA	GCC	GGG	ATG	GTG	GTG	ATG	GTT	GAT	GGT	GCT	CAG	868
Thr	Phe	Ala	His	Ser	Ala	Gly	Met	Val	Val	Met	Val	Asp	Gly	Ala	Gln	
	185					190					195					
GGG	GCA	GTG	CAT	TTC	CCC	GCG	GAT	GTT	CAG	CAA	CTG	GAT	ATT	GAT	TTC	916
Gly	Ala	Val	His	Phe	Pro	Ala	Asp	Val	Gln	Gln	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe	
200					205					210					215	
TAT	GCT	TTT	TCA	GGT	CAC	AAA	CTG	TAT	GGC	CCG	ACA	GGT	ATC	GGC	GTG	964
Tyr	Ala	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Leu	Tyr	Gly	Pro	Thr	Gly	Ile	Gly	Val	
				220					225						230	
CTG	TAT	GGT	AAA	TCA	GAA	CTG	CTG	GAG	GCG	ATG	TCG	CCC	TGG	CTG	GGC	1012
Leu	Tyr	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Met	Ser	Pro	Trp	Leu	Gly	
			235					240							245	
GGC	GGC	AAA	ATG	GTT	CAC	GAA	GTG	AGT	TTT	GAC	GGC	TTC	ACG	ACT	CAA	1060
Gly	Gly	Lys	Met	Val	His	Glu	Val	Ser	Phe	Asp	Gly	Phe	Thr	Thr	Gln	
		250					255					260				
TCT	GCG	CCG	TGG	AAA	CTG	GAA	GCT	GGA	ACG	CCA	AAT	GTC	GCT	GGT	GTC	1108
Ser	Ala	Pro	Trp	Lys	Leu	Glu	Ala	Gly	Thr	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Val	
	265					270					275					
ATA	GGA	TTA	AGC	GCG	GCG	CTG	GAA	TGG	CTG	GCA	GAT	TAC	GAT	ATC	AAC	1156
Ile	Gly	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asn	
280					285					290					295	
CAG	GCC	GAA	AGC	TGG	AGC	CGT	AGC	TTA	GCA	ACG	CTG	GCG	GAA	GAT	GCG	1204
Gln	Ala	Glu	Ser	Trp	Ser	Arg	Ser	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	
				300					305						310	
CTG	GCG	AAA	CGT	CCC	GGC	TTT	CGT	TCA	TTC	CGC	TGC	CAG	GAT	TCC	AGC	1252
Leu	Ala	Lys	Arg	Pro	Gly	Phe	Arg	Ser	Phe	Arg	Cys	Gln	Asp	Ser	Ser	
				315					320						325	

CTG CTG GCC TTT GAT TTT GCT GGC GTT CAT CAT AGC GAT ATG GTG ACG	1300
Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val His His Ser Asp Met Val Thr	
330 335 340	
CTG CTG GCG GAG TAC GGT ATT GCC CTG CGG GCC GGG CAG CAT TGC GCT	1348
Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu Arg Ala Gly Gln His Cys Ala	
345 350 355	
CAG CCG CTA CTG GCA GAA TTA GGC GTA ACC GGC ACA CTG CGC GCC TCT	1396
Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser	
360 365 370 375	
TTT GCG CCA TAT AAT ACA AAG AGT GAT GTG GAT GCG CTG GTG AAT GCC	1444
Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp Val Asp Ala Leu Val Asn Ala	
380 385 390	
GTT GAC CGC GCG CTG GAA TTA TTG GTG GAT TAAACGCGTG CTAGAGGCAT	1494
Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val Asp	
395 400	
CAAATAAAAC GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC TGGGCCTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTCTG	1554
GTGAACGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT ATATTCCGCT	1614
TCCTCGCTCA CTGACTCGCT ACGCTCGGTC GTTCGACTGC GGCGAGCGGA AATGGCTTAC	1674
GAACGGGGCG GAGATTTTCCT GGAAGATGCC AGGAAGATAC TTAACAGGGA AGTGAGAGGG	1734
CCGCGGCAAA GCCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CAAGCATCAC GAAATCTGAC	1794
GCTCAAAATCA GTGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG	1854
GCGGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCCTG CCTTTCGGTT TACCGGTGTC ATTCCGCTGT	1914
TATGGCCGCG TTTGTCTCAT TCCACGCCTG AACTCAGTT CCGGGTAGGC AGTTCGCTCC	1974
AAGCTGGACT GTATGCACGA ACCCCCCGTT CAGTCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC	2034
TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGAAAGACAT GCAAAAGCAC CACTGGCAGC AGCCACTGGT	2094
AATTGATTTA GAGGAGTTAG TCTTGAAGTC ATGCGCCGGT TAAGGCTAAA CTGAAAGGAC	2154
AAGTTTGGT GACTGCGCTC CTCCAAGCCA GTTACCTCGG TTCAAAGAGT TGGTAGCTCA	2214
GAGAACCTTC GAAAAACCGC CCTGCAAGGC GGTTTTTTTCG TTTTCAGAGC AAGAGATTAC	2274
GCGCAGACCA AAACGATCTC AAGAAGATCA TCTTATTAAT CAGATAAAAT ATTTCTAGAT	2334
TTCAGTGCAA TTTATCTCTT CAAATGTAGC ACCTGAAGTC AGCCCCATAC GATATAAGTT	2394
GTTACTAGTG CTTGGATTCT CACCAATAAA AAACGCCCCG CGGCAACCGA GCGTTCTGAA	2454
CAAATCCAGA TGGAGTTCTG AGGTCATTAC TGGATCTATC AACAGGAGTC CAAGCGAGCT	2514
CTCGAACCCC AGAGTCCCCG TCAGAAGAAC TCGTCAAGAA GGCGATAGAA GGCGATGCGC	2574

```

TGCGAATCGG GAGCGGCGAT ACCGTAAAGC ACGAGGAAGC GGTCAGCCCA TTCGCCGCCA      2634
AGCTCTTCAG CAATATCACG GGTAGCCAAC GCTATGTCCT GATAGCGGTC CGCCACACCC      2694
AGCCGGCCAC AGTCGATGAA TCCAGAAAAG CGGCCATTTT CCACCATGAT ATTCGGCAAG      2754
CAGGCATCGC CATGGGTCAC GACGAGATCC TCGCCGTCGG GCATGCGCGC CTTGAGCCTG      2814
GCGAACAGTT CGGCTGGCGC GAGCCCCTGA TGCTCTTCGT CCAGATCATC CTGATCGACA      2874
AGACCGGCTT CCATCCGAGT ACGTGCTCGC TCGATGCGAT GTTTCGCTTG GTGGTCGAAT      2934
GGGCAGGTAG CCGGATCAAG CGTATGCAGC CGCCGCATTG CATCAGCCAT GATGGATACT      2994
TTCTCGGCAG GAGCAAGGTG AGATGACAGG AGATCCTGCC CCGGCACTTC GCCCAATAGC      3054
AGCCAGTCCC TTCCCGCTTC AGTGACAACG TCGAGCACAG CTGCGCAAGG AACGCCCCTC      3114
GTGGCCAGCC ACGATAGCCG CGCTGCCTCG TCCTGCAGTT CATTCAGGGC ACCGGACAGG      3174
TCGGTCTTGA CAAAAGAAGC CGGGCGCCCC TCGGCTGACA GCCGGAACAC GGCGGCATCA      3234
GAGCAGCCGA TTGTCTGTTG TGCCCAGTCA TAGCCGAATA GCCTCTCCAC CCAAGCGGCC      3294
GGAGAACCTG CGTGCAATCC ATCTTGTTCA ATCATGCGAA ACGATCCTCA TCCTGTCTCT      3354
TGATCAGATC TTGATCCCCT GCGCCATCAG ATCCTTGGCG GCAAGAAAGC CATCCAGTTT      3414
ACTTTGCAGG GCTTCCCAAC CTTACCAGAG GGCGCCCCAG CTGGCAATTC C      3465

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 401 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

```

Met Asn Val Phe Asn Pro Ala Gln Phe Arg Ala Gln Phe Pro Ala Leu
 1             5             10             15
Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Asp Ser Ala Ala Thr Ala Leu Lys Pro
          20             25             30
Glu Ala Val Val Glu Ala Thr Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Ser Ala Gly
          35             40             45
Asn Val His Arg Ser Gln Phe Ala Glu Ala Gln Arg Leu Thr Ala Arg
          50             55             60
Tyr Glu Ala Ala Arg Glu Lys Val Ala Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp
65             70             75             80

```

Asp Lys Thr Ile Val Trp Thr Arg Gly Thr Thr Glu Ser Ile Asn Met
 85 90 95

Val Ala Gln Cys Tyr Ala Arg Pro Arg Leu Gln Pro Gly Asp Glu Ile
 100 105 110

Ile Val Ser Val Ala Glu His His Ala Asn Leu Val Pro Trp Leu Met
 115 120 125

Val Ala Gln Gln Thr Gly Ala Lys Val Val Lys Leu Pro Leu Asn Ala
 130 135 140

Gln Arg Leu Pro Asp Val Asp Leu Leu Pro Glu Leu Ile Thr Pro Arg
 145 150 155 160

Ser Arg Ile Leu Ala Leu Gly Gln Met Ser Asn Val Thr Gly Gly Cys
 165 170 175

Pro Asp Leu Ala Arg Ala Ile Thr Phe Ala His Ser Ala Gly Met Val
 180 185 190

Val Met Val Asp Gly Ala Gln Gly Ala Val His Phe Pro Ala Asp Val
 195 200 205

Gln Gln Leu Asp Ile Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Gly His Lys Leu Tyr
 210 215 220

Gly Pro Thr Gly Ile Gly Val Leu Tyr Gly Lys Ser Glu Leu Leu Glu
 225 230 235 240

Ala Met Ser Pro Trp Leu Gly Gly Gly Lys Met Val His Glu Val Ser
 245 250 255

Phe Asp Gly Phe Thr Thr Gln Ser Ala Pro Trp Lys Leu Glu Ala Gly
 260 265 270

Thr Pro Asn Val Ala Gly Val Ile Gly Leu Ser Ala Ala Leu Glu Trp
 275 280 285

Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Asn Gln Ala Glu Ser Trp Ser Arg Ser Leu
 290 295 300

Ala Thr Leu Ala Glu Asp Ala Leu Ala Lys Arg Pro Gly Phe Arg Ser
 305 310 315 320

Phe Arg Cys Gln Asp Ser Ser Leu Leu Ala Phe Asp Phe Ala Gly Val
 325 330 335

His His Ser Asp Met Val Thr Leu Leu Ala Glu Tyr Gly Ile Ala Leu
 340 345 350

Arg Ala Gly Gln His Cys Ala Gln Pro Leu Leu Ala Glu Leu Gly Val
 355 360 365

Thr Gly Thr Leu Arg Ala Ser Phe Ala Pro Tyr Asn Thr Lys Ser Asp
 370 375 380

Val Asp Ala Leu Val Asn Ala Val Asp Arg Ala Leu Glu Leu Leu Val
 385 390 395 400

Asp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3481 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pHS2bioS2

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 279..1493

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG	60
CCCTTTCGTC TTCACCTCGA GTCCCTATCA GTGATAGAGA TTGACATCCC TATCAGTGAT	120
AGAGATACTG AGCACATCAG CAGGACGCAC TGACCGAATT CATTAAAGAG GAGAAAGGTA	180
CCGGGCCCCC CCTCGAGGTC GACGGTATCG ATAAGCTTGA TATCGAATTC GTGCAGCCCCG	240
GGGGATCCCA TGGTACGCGT AAAGAGGAGA AATTAACT ATG AAA TTA CCG ATT	293
Met Lys Leu Pro Ile	
1 5	
TAT CTC GAC TAC TCC GCA ACC ACG CCG GTG GAC CCG CGT GTT GCC GAG	341
Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro Val Asp Pro Arg Val Ala Glu	
10 15 20	
AAA ATG ATG CAG TTT ATG ACG ATG GAC GGA ACC TTT GGT AAC CCG GCC	389
Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp Gly Thr Phe Gly Asn Pro Ala	
25 30 35	

TCC CGT TCT CAC CGT TTC GGC TGG CAG GCT GAA GAA GCG GTA GAT ATC	437
Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln Ala Glu Glu Ala Val Asp Ile	
40 45 50	
GCC CGT AAT CAG ATT GCC GAT CTG GTC GGC GCT GAT CCG CGT GAA ATC	485
Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val Gly Ala Asp Pro Arg Glu Ile	
55 60 65	
GTC TTT ACC TCT GGT GCA ACC GAA TCT GAC AAC CTG GCG ATC AAA GGT	533
Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser Asp Asn Leu Ala Ile Lys Gly	
70 75 80 85	
GCA GCC AAC TTT TAT CAG AAA AAA GGC AAG CAC ATC ATC ACC AGC AAA	581
Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly Lys His Ile Ile Thr Ser Lys	
90 95 100	
ACC GAA CAC AAA GCG GTA CTG GAT ACC TGC CGT CAG CTG GAG CGC GAA	629
Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr Cys Arg Gln Leu Glu Arg Glu	
105 110 115	
GGT TTT GAA GTC ACC TAC CTG GCA CCG CAG CGT AAC GGC ATT ATC GAC	677
Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro Gln Arg Asn Gly Ile Ile Asp	
120 125 130	
CTG AAA GAA CTT GAA GCA GCG ATG CGT GAC GAC ACC ATC CTC GTG TCC	725
Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg Asp Asp Thr Ile Leu Val Ser	
135 140 145	
ATC ATG CAC GTA AAT AAC GAA ATC GGC GTG GTG CAG GAT ATC GCG GCT	773
Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly Val Val Gln Asp Ile Ala Ala	
150 155 160 165	
ATC GGC GAA ATG TGC CGT GCT CGT GGC ATT ATC TAT CAC GTT GAT GCA	821
Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly Ile Ile Tyr His Val Asp Ala	
170 175 180	
ACC CAG AGC GTG GGT AAA CTG CCT ATC GAC CTG AGC CAG TTG AAA GTT	869
Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu Ser Gln Leu Lys Val	
185 190 195	
GAC CTG ATG TCT TTC TCC GGT CAC AAA ATC TAT GGC CCG AAA GGT ATC	917
Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Gly Ile	
200 205 210	
GGT GCG CTG TAT GTA CGT CGT AAA CCG CGC GTA CGC ATC GAA GCG CAA	965
Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val Arg Ile Glu Ala Gln	
215 220 225	
ATG CAC GGC GGC GGT CAC GAG CGC GGT ATG CGT TCC GGC ACT CTG CCT	1013
Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg Ser Gly Thr Leu Pro	
230 235 240 245	

GTT CAC CAG ATC GTC GGA ATG GGC GAG GCC TAT CGC ATC GCA AAA GAA	1061
Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr Arg Ile Ala Lys Glu	
250 255 260	
GAG ATG GCG ACC GAG ATG GAA CGT CTG CGC GGC CTG CGT AAC CGT CTG	1109
Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly Leu Arg Asn Arg Leu	
265 270 275	
TGG AAC GGC ATC AAA GAT ATC GAA GAA GTT TAC CTG AAC GGT GAC CTG	1157
Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu	
280 285 290	
GAA CAC GGT GCG CCG AAC ATT CTC AAC GTC AGC TTC AAC TAC GTT GAA	1205
Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser Phe Asn Tyr Val Glu	
295 300 305	
GGT GAG TCG CTG ATT ATG GCG CTG AAA GAC CTC GCA GTT TCT TCA GGT	1253
Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu Ala Val Ser Ser Gly	
310 315 320 325	
TCC GCC TGT ACG TCA GCA AGC CTC GAA CCG TCC TAC GTG CTG CGC GCG	1301
Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser Tyr Val Leu Arg Ala	
330 335 340	
CTG GGG CTG AAC GAC GAG CTG GCA CAT AGC TCT ATC CGT TTC TCT TTA	1349
Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser Ile Arg Phe Ser Leu	
345 350 355	
GGT CGT TTT ACT ACT GAA GAA GAG ATC GAC TAC ACC ATC GAG TTA GTT	1397
Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr Thr Ile Glu Leu Val	
360 365 370	
CGT AAA TCC ATC GGT CGT CTG CGT GAC CTT TCT CCG CTG TGG GAA ATG	1445
Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser Pro Leu Trp Glu Met	
375 380 385	
TAC AAG CAG GGC GTG GAT CTG AAC AGC ATC GAA TGG GCT CAT CAT TAAACGCGTG	1500
Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu Trp Ala His His	
390 395 400 405	
CTAGAGGCAT CAAATAAAAC GAAAGGCTCA GTCGAAAGAC TGGGCCTTTC GTTTTATCTG	1560
TTGTTTGTCTG GTGAACGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCCCTAGA CCTAGGGGAT	1620
ATATTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT ACGCTCGGTC GTTCGACTGC GGCGAGCGGA	1680
AATGGCTTAC GAACGGGGCG GAGATTTTCCT GGAAGATGCC AGGAAGATAC TTAACAGGGA	1740
AGTGAGAGGG CCGCGGCAAA GCCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CAAGCATCAC	1800
GAAATCTGAC GCTCAAATCA GTGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG	1860
TTTCCCCCTG GCGGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCTTG CCTTTCGGTT TACCGGTGTC	1920

ATTCCGCTGT	TATGGCCGCG	TTTGTCTCAT	TCCACGCCTG	ACACTCAGTT	CCGGGTAGGC	1980
AGTTCGCTCC	AAGCTGGACT	GTATGCACGA	ACCCCCGTT	CAGTCCGACC	GCTGCGCCTT	2040
ATCCGGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC	GGAAAGACAT	GCAAAAGCAC	CACTGGCAGC	2100
AGCCACTGGT	AATTGATTTA	GAGGAGTTAG	TCTTGAAGTC	ATGCGCCGGT	TAAGGCTAAA	2160
CTGAAAGGAC	AAGTTTTGGT	GA CTGCGCTC	CTCCAAGCCA	GTTACCTCGG	TTCAAAGAGT	2220
TGGTAGCTCA	GAGAACCCTC	GAAAAACCGC	CCTGCAAGGC	GGTTTTTTTCG	TTTTTCAGAGC	2280
AAGAGATTAC	GCGCAGACCA	AAACGATCTC	AAGAAGATCA	TCTTATTAAT	CAGATAAAAT	2340
ATTTCTAGAT	TTCAGTGCAA	TTTATCTCTT	CAAATGTAGC	ACCTGAAGTC	AGCCCCATAC	2400
GATATAAGTT	GTTACTAGTG	CTTGATTCT	CACCAATAAA	AAACGCCCCG	CGGCAACCGA	2460
GCGTTCTGAA	CAAATCCAGA	TGGAGTTCTG	AGGTCATTAC	TGGATCTATC	AACAGGAGTC	2520
CAAGCGAGCT	CTCGAACCCC	AGAGTCCCGC	TCAGAAGAAC	TCGTCAAGAA	GGCGATAGAA	2580
GGCGATGCGC	TGCGAATCGG	GAGCGGCGAT	ACCGTAAAGC	ACGAGGAAGC	GGTCAGCCCA	2640
TTCGCCGCCA	AGCTCTTCAG	CAATATCACG	GGTAGCCAAC	GCTATGTCCT	GATAGCGGTC	2700
CGCCACACCC	AGCCGGCCAC	AGTCGATGAA	TCCAGAAAAG	CGGCCATTTT	CCACCATGAT	2760
ATTCTGGCAAG	CAGGCATCGC	CATGGGTCAC	GACGAGATCC	TCGCCGTCGG	GCATGCGCGC	2820
CTTGAGCCTG	GCGAACAGTT	CGGCTGGCGC	GAGCCCCTGA	TGCTCTTCGT	CCAGATCATC	2880
CTGATCGACA	AGACCGGCTT	CCATCCGAGT	ACGTGCTCGC	TCGATGCGAT	GTTTCGCTTG	2940
GTGGTCGAAT	GGGCAGGTAG	CCGGATCAAG	CGTATGCAGC	CGCCGCATTG	CATCAGCCAT	3000
GATGGATACT	TTCTCGGCAG	GAGCAAGGTG	AGATGACAGG	AGATCCTGCC	CCGGCACTTC	3060
GCCCAATAGC	AGCCAGTCCC	TTCCCGCTTC	AGTGACAACG	TCGAGCACAG	CTGCGCAAGG	3120
AACGCCCCGTC	GTGGCCAGCC	ACGATAGCCG	CGCTGCCTCG	TCCTGCAGTT	CATTCAGGGC	3180
ACCGGACAGG	TCGGTCTTGA	CAAAAAGAAC	CGGGCGCCCC	TGCGCTGACA	GCCGGAACAC	3240
GGCGGCATCA	GAGCAGCCGA	TTGTCTGTTG	TGCCCAGTCA	TAGCCGAATA	GCCTCTCCAC	3300
CCAAGCGGCC	GGAGAACCTG	CGTGCAATCC	ATCTTGTTCA	ATCATGCGAA	ACGATCCTCA	3360
TCCTGTCTCT	TGATCAGATC	TTGATCCCCT	GCGCCATCAG	ATCCTTGGCG	GCAAGAAAGC	3420
CATCCAGTTT	ACTTTGCAGG	GCTTCCCAAC	CTTACCAGAG	GGCGCCCCAG	CTGGCAATTC	3480
C						3481

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 404 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Lys Leu Pro Ile Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Thr Thr Pro Val Asp
 1 5 10 15

Pro Arg Val Ala Glu Lys Met Met Gln Phe Met Thr Met Asp Gly Thr
 20 25 30

Phe Gly Asn Pro Ala Ser Arg Ser His Arg Phe Gly Trp Gln Ala Glu
 35 40 45

Glu Ala Val Asp Ile Ala Arg Asn Gln Ile Ala Asp Leu Val Gly Ala
 50 55 60

Asp Pro Arg Glu Ile Val Phe Thr Ser Gly Ala Thr Glu Ser Asp Asn
 65 70 75 80

Leu Ala Ile Lys Gly Ala Ala Asn Phe Tyr Gln Lys Lys Gly Lys His
 85 90 95

Ile Ile Thr Ser Lys Thr Glu His Lys Ala Val Leu Asp Thr Cys Arg
 100 105 110

Gln Leu Glu Arg Glu Gly Phe Glu Val Thr Tyr Leu Ala Pro Gln Arg
 115 120 125

Asn Gly Ile Ile Asp Leu Lys Glu Leu Glu Ala Ala Met Arg Asp Asp
 130 135 140

Thr Ile Leu Val Ser Ile Met His Val Asn Asn Glu Ile Gly Val Val
 145 150 155 160

Gln Asp Ile Ala Ala Ile Gly Glu Met Cys Arg Ala Arg Gly Ile Ile
 165 170 175

Tyr His Val Asp Ala Thr Gln Ser Val Gly Lys Leu Pro Ile Asp Leu
 180 185 190

Ser Gln Leu Lys Val Asp Leu Met Ser Phe Ser Gly His Lys Ile Tyr
 195 200 205

Gly Pro Lys Gly Ile Gly Ala Leu Tyr Val Arg Arg Lys Pro Arg Val
 210 215 220

Arg Ile Glu Ala Gln Met His Gly Gly Gly His Glu Arg Gly Met Arg
 225 230 235 240

Ser Gly Thr Leu Pro Val His Gln Ile Val Gly Met Gly Glu Ala Tyr
245 250 255

Arg Ile Ala Lys Glu Glu Met Ala Thr Glu Met Glu Arg Leu Arg Gly
260 265 270

Leu Arg Asn Arg Leu Trp Asn Gly Ile Lys Asp Ile Glu Glu Val Tyr
275 280 285

Leu Asn Gly Asp Leu Glu His Gly Ala Pro Asn Ile Leu Asn Val Ser
290 295 300

Phe Asn Tyr Val Glu Gly Glu Ser Leu Ile Met Ala Leu Lys Asp Leu
305 310 315 320

Ala Val Ser Ser Gly Ser Ala Cys Thr Ser Ala Ser Leu Glu Pro Ser
325 330 335

Tyr Val Leu Arg Ala Leu Gly Leu Asn Asp Glu Leu Ala His Ser Ser
340 345 350

Ile Arg Phe Ser Leu Gly Arg Phe Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp Tyr
355 360 365

Thr Ile Glu Leu Val Arg Lys Ser Ile Gly Arg Leu Arg Asp Leu Ser
370 375 380

Pro Leu Trp Glu Met Tyr Lys Gln Gly Val Asp Leu Asn Ser Ile Glu
385 390 395 400

Trp Ala His His

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 98/04097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/54 C12N9/10 C12N5/10 C12N1/21 C12P17/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 635 572 A (HOFFMANN LA ROCHE) 25 January 1995 see the whole document; in particular page 26, line 9-11; and example 10 ---	1-12
Y	ZHENG L ET AL: "CATALYTIC FORMATION OF A NITROGENASE IRON-SULFUR CLUSTER" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 29, 22 July 1994, pages 18723-18726, XP002034651 see page 18725, right hand column, line 20-28 ---	1-12
P, X	EP 0 806 479 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12 November 1997 see page 2, line 41-47; page 4, line 4-11; example 7 --- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 1998

Date of mailing of the international search report

09/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, 0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No

PCT/EP 98/04097

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SANYAL I ET AL: "BIOTIN SYNTHASE: PURIFICATION, CHARACTERIZATION AS A 2FE-2SCLUSTER PROTEIN, AND IN VITRO ACTIVITY OF THE ESCHERICHIA COLI BIOB GENE PRODUCT" BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 12, 1994, pages 3625-3631, XP002034650 see page 3630, paragraph 3 ---</p>	11
A	<p>IFUKU O ET AL: "FLAVODOXIN IS REQUIRED FOR CONVERSION OF DETHIOBIOTIN TO BIOTIN IN ESCHERICHIA COLI" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 224, no. 1, August 1994, pages 173-178, XP002034653 Mentions need for other prot than flavodixin ---</p>	
A	<p>ZHENG L ET AL: "CYSTEINE DESULFURASE ACTIVITY INDICATES A ROLE FOR NIFS IN METALLOCLUSTER BIOSYNTHESIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, April 1993, pages 2754-2758, XP002034652 cited in the application -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0635572 A	25-01-1995	CN 1106066 A JP 7231789 A	02-08-1995 05-09-1995
EP 0806479 A	12-11-1997	CN 1170762 A JP 10033189 A	21-01-1998 10-02-1998

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/54 C12N9/10 C12N5/10 C12N1/21 C12P17/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 635 572 A (HOFFMANN LA ROCHE) 25. Januar 1995 siehe das ganze Dokument; besonders Seite 26, Zeile 9-11; und Beispiel 10 ---	1-12
Y	ZHENG L ET AL: "CATALYTIC FORMATION OF A NITROGENASE IRON-SULFUR CLUSTER" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 269, Nr. 29, 22. Juli 1994, Seiten 18723-18726, XP002034651 siehe Seite 18725, rechte Spalte, Zeile 20-28 ---	1-12
P, X	EP 0 806 479 A (HOFFMANN LA ROCHE) 12. November 1997 siehe Seite 2, Zeile 41-47; Seite 4, Zeile 4-11; Beispiel 7 --- -/--	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung miteinander oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. Oktober 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lonnoy, O

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SANYAL I ET AL: "BIOTIN SYNTHASE: PURIFICATION, CHARACTERIZATION AS A 2FE-2SCLUSTER PROTEIN, AND IN VITRO ACTIVITY OF THE ESCHERICHIA COLI BIOB GENE PRODUCT"</p> <p>BIOCHEMISTRY, Bd. 33, Nr. 12, 1994, Seiten 3625-3631, XP002034650 siehe Seite 3630, Absatz 3</p> <p>---</p>	11
A	<p>IFUKU O ET AL: "FLAVODOXIN IS REQUIRED FOR CONVERSION OF DETHIOBIOTIN TO BIOTIN IN ESCHERICHIA COLI"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 224, Nr. 1, August 1994, Seiten 173-178, XP002034653 Mentions need for other prot than flavodixin</p> <p>---</p>	
A	<p>ZHENG L ET AL: "CYSTEINE DESULFURASE ACTIVITY INDICATES A ROLE FOR NIFS IN METALLOCLUSTER BIOSYNTHESIS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 90, April 1993, Seiten 2754-2758, XP002034652 in der Anmeldung erwähnt</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die der selben Patentfamilie gehören

des Aktenzeichens

PCT/EP 98/04097

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0635572 A	25-01-1995	CN 1106066 A	02-08-1995
		JP 7231789 A	05-09-1995
EP 0806479 A	12-11-1997	CN 1170762 A	21-01-1998
		JP 10033189 A	10-02-1998